

VALORISATION DE BIOCATALYSEURS ENZYMATIQUES POUR LE TRAITEMENT D'EAUX  
POLLUÉES PAR DES CONTAMINANTS ORGANIQUES EN TRACES

Par  
Komla Alokpa

Mémoire présenté au Centre universitaire de formation  
en environnement et développement durable en vue  
de l'obtention du grade de maîtrise en environnement (M. Env.)

Sous la direction de Hubert Cabana  
et la codirection de François Lafortune

MAÎTRISE EN ENVIRONNEMENT  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Avril 2020

## **MEMBRES DU JURY**

### **Hubert Cabana**

Département de génie civil et de génie du bâtiment de l'Université de Sherbrooke  
Directeur

### **François Lafortune**

Centre universitaire de formation en environnement et développement durable de l'Université de Sherbrooke  
Codirecteur

### **Roland Leduc**

Département de génie civil et de génie du bâtiment de l'Université de Sherbrooke (à la retraite)  
Évaluateur interne

### **Patrick Drogui**

INRS-ÉTÉ  
Évaluateur externe

## SOMMAIRE

Mots-clés : laccase, hydrolases, enzymes, combi-CLEA, contaminants organiques en traces, eaux usées.

Un consensus existe aujourd'hui concernant les effets négatifs potentiels ou établis des contaminants organiques en traces sur les organismes aquatiques et les humains, tels que la perturbation du système endocrinien ou du système reproducteur et les effets mutagènes. Les contaminants organiques en traces comprennent une grande variété de composés chimiques dont les polluants organiques persistants (ex. : pesticides), les contaminants émergents tels que les produits pharmaceutiques ou les produits de soins personnels et les additifs industriels.

Par ailleurs, une situation de crise énergétique caractérise le contexte mondial actuel. De plus, en raison des effets des changements climatiques, cette situation incite à la protection et à la restauration de l'environnement. Par conséquent, les technologies appliquées pour l'enlèvement des contaminants organiques en traces doivent démontrer leur efficacité énergétique et économique ainsi que leur innocuité pour l'environnement. Les traitements par catalyse enzymatique se distinguent par certaines caractéristiques telles que les pH et les températures modérés, la biodégradabilité des enzymes ou l'innocuité des produits générés. De par ces éléments, ces traitements pourraient constituer une alternative ou un complément de taille aux traitements biologiques et chimiques pour l'enlèvement de ces contaminants dans les eaux usées.

Dans cette étude, le potentiel d'élimination par catalyse enzymatique de 22 composés à 10 µg/l chacun a été examiné avec un effluent fabriqué en laboratoire. Comme catalyseurs, une laccase fongique de *Trametes hirsuta*, un mélange d'hydrolases (amylase, lipase, cellulase et protéase) et un catalyseur immobilisé sous forme d'agrégats réticulés de ces 5 enzymes ont été testés. L'impact des conditions opératoires telles que le pH, la température et le temps de contact a été également déterminé. Le catalyseur immobilisé a été formé à partir d'un mélange 1:1 (v/v) de préparations de laccase et du mélange d'hydrolases, avec 60 % (m/v) de sulfate d'ammonium (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> comme agent précipitant et 40 mM de glutaraldéhyde (GLA) comme agent de réticulation. La lipase a affiché une hyperactivation de 663,3 % alors que pour les autres enzymes, les rendements d'immobilisation variaient de 25,5 % à 49,2 % en utilisant les substrats spécifiques.

Après un traitement de 24 h à 22 °C et au pH 7, la sulfaméthazine et l'acétaminophène ont montré des rendements d'élimination respectifs de 100 % et 99 % en présence de la laccase, alors que la venlafaxine (99 %), le triméthoprim (97 %) et l'acétaminophène (96 %) étaient quasiment éliminés au contact du mélange d'hydrolases. Avec le catalyseur immobilisé, l'acétaminophène a été dégradé à 89 %, suivi du diazinon (61 %) et de la lincomycine (60 %), après 24 h de traitement à 22 °C et au pH 7. L'étude de l'impact du pH sur l'élimination des contaminants, déterminé sur la plage de pH 6 à 8, n'a pas montré une disparité

claire. En ce qui concerne l'impact de la température, globalement, les taux d'élimination les plus élevés ont été atteints à 22 °C, avec les enzymes libres et le catalyseur immobilisé. Finalement, pour l'impact du temps de contact, après 4 h de traitement, les rendements d'élimination observés sont inférieurs à ceux obtenus en 24 h de traitement.

Cette étude a montré que la laccase, le mélange d'amylase, de lipase, de cellulase et de protéase ainsi que le catalyseur insolubilisé préparé par réticulation des agrégats de ces cinq enzymes, ont un réel potentiel pour le traitement des eaux usées, notamment pour l'enlèvement des contaminants organiques en traces. De plus, en optimisant les conditions de production du catalyseur insolubilisé, il pourrait concentrer une bonne partie de la capacité catalytique des enzymes libres de départ et constituer un catalyseur stable à large spectre d'action.

## REMERCIEMENTS

Ce document me donne l'occasion d'adresser mes profonds remerciements à différentes personnes grâce auxquelles ce travail a connu cet heureux aboutissement.

D'emblée, je voudrais dire merci à M. François Lafortune, mon codirecteur de recherche. Sans hésitation, il m'a reçu, s'est ouvert à moi, et promptement, s'est assigné les tâches préliminaires des prises de contact avec mon directeur de recherche. François était aussi là pour redonner de l'énergie et le goût à l'ouvrage dans les moments où cela était nécessaire. J'ai également appris beaucoup de choses en chimie organique avec François.

Je voudrais exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, M. Hubert Cabana. Malgré mon énergie et ma détermination initiales, ô que ce ne fût pas d'emblée évident! En tout cas, merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir conduit par petits pas vers l'initiation à la recherche. Je suis également très reconnaissant à Hubert pour sa disponibilité et l'atmosphère empreinte d'humanité qu'il a su créer lors de nos rencontres de suivi. Finalement, je le remercie pour la gestion globale de cette recherche, pour la recherche et la fourniture en temps opportuns des ressources matérielles et financières nécessaires.

À tout le personnel du CUFE des campus de Longueuil et de Sherbrooke, mes remerciements pour leurs enseignements et conseils.

J'aimerais également exprimer toute ma gratitude à l'homme qui fut au cœur de tout l'aspect pratique de ce travail, M. Olivier Savary, coordonnateur du Laboratoire de génie de l'environnement au Département de génie civil et de génie du bâtiment. Merci à Olivier pour sa gestion de la logistique ainsi que tout le temps et l'énergie qu'il a consacrés à la réalisation de mes analyses.

Je ne pourrai passer sous silence les apports précieux de celle et ceux qui ont accepté volontiers de partager avec moi leurs connaissances et leurs expériences en recherche, Arielle, Vasanth et Vinoth. Un chaleureux merci!

Enfin, je tiens à exprimer ma reconnaissance au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), au programme Foncer en Technologies environnementales de décontamination et de gestion intégrée des eaux et effluents résiduaux (TEDGIEER), et au partenaire industriel du projet de recherche, Nuvac Écosciences Inc. pour leurs supports matériels, financiers et de formation.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 REVUE DE LITTÉRATURE .....</b>	<b>6</b>
1.1 Composés organiques en traces.....	6
1.1.1 Perturbateurs endocriniens.....	6
1.1.2 Produits pharmaceutiques .....	8
1.1.3 Pesticides.....	10
1.1.4 Produits de soins personnels .....	11
1.2 Sources et voies de contamination de l'environnement .....	12
1.3 Aspects réglementaires.....	12
1.4 Aperçu de quelques techniques de traitements des TrOC .....	15
1.4.1 Biodégradation .....	15
1.4.2 Procédés d'oxydation avancés .....	15
<b>2 ENZYMES À L'ÉTUDE .....</b>	<b>16</b>
2.1 Facteurs affectant l'enlèvement des TrOC par les enzymes.....	16
2.2 Les laccases (EC 1.10.3.2) .....	17
2.3 Enzymes hydrolytiques .....	20
2.3.1 Les amylases (EC 3.2.1.1).....	20
2.3.2 Les lipases (EC 3.1.1.3) .....	21
2.3.3 Les cellulases (EC 3.2.1...).....	23
2.3.4 Les protéases (EC 3.4...) .....	24
2.4 Immobilisation enzymatique .....	25
2.4.1 L'immobilisation sur supports .....	26
2.4.2 L'encapsulation.....	27
2.4.3 La formation d'agrégats d'enzymes réticulés .....	27
<b>3 UTILISATION DE LA LACCASE, D'UN MELANGE D'HYDROLASES ET D'UNE COMBINAISON DE CES ENZYMES POUR L'ENLÈVEMENT DE CONTAMINANTS ORGANIQUES EN TRACES DANS UNE EAU USÉE SYNTHÉTIQUE .....</b>	<b>29</b>
3.1 Contaminants ciblés .....	30
3.2 Section expérimentale .....	36
3.2.1 Réactifs chimiques .....	36
3.2.2 Préparation des solutions d'enzymes libres .....	36

3.2.3	Activités enzymatiques .....	36
3.2.4	Préparation de la combi-CLEA.....	38
3.2.5	Paramètres cinétiques des catalyseurs.....	39
3.2.6	Préparation des solutions de contaminants (TrOC).....	40
3.2.7	Test d'élimination des TrOC par les catalyseurs .....	40
3.2.8	Stabilité des enzymes par rapport au milieu réactionnel.....	41
3.2.9	Impact du pH, de la température et du temps de contact .....	41
3.2.10	Extraction en phase solide des TrOC .....	42
3.2.11	Quantification des molécules d'intérêt par UPLC/MS/MS.....	42
3.3	Résultats et discussions .....	42
3.3.1	Rendements d'immobilisation enzymatique de la combi-CLEA.....	43
3.3.2	Paramètres cinétiques des catalyseurs.....	44
3.3.3	Stabilité des enzymes .....	47
3.3.4	Potentiel d'élimination des TrOC .....	47
3.3.5	Impact du pH, de la température et du temps de contact sur l'élimination des TrOC ....	52
<b>CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....</b>		<b>65</b>

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1.1 Sources et voies de contamination de l'environnement par les TrOC .....	13
Figure 2.1 Cycle catalytique de la laccase.....	19
Figure 2.2 Schéma simplifié de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase. ....	21
Figure 2.3 Mécanisme d'hydrolyse de la trioléine par la lipase <i>Candida rugosa</i> dans un système biphasique huile-eau.....	22
Figure 2.4 Mécanisme de l'hydrolyse de la cellulose par les systèmes cellulolytiques fongiques .....	24
Figure 2.5 Principales voies de dégradation des substrats protéiques par protéolyse .....	25
Figure 2.6 Différentes stratégies d'immobilisation enzymatique.....	26
Figure 2.7 Préparation d'agrégats d'enzymes réticulés (CLEA).....	28
Figure 3.1 Stabilité des enzymes libres et de la combi-CLEA après 24 h d'incubation .....	47
Figure 3.2 Élimination des TrOC après 24 h de traitement à 22 °C, pH 7 par a) la laccase (1000 U/l), b) le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et c) 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g)).....	52
Figure 3.3 Élimination des TrOC après 24 h de traitement à 22 °C, aux pH 6, 7 et 8, par laccase (1000 U/l), le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g)) .....	56
Figure 3.4 Élimination des TrOC après 24 h de traitement, au pH 7, à 4 °C, 22 °C et 30 °C, par la laccase (1000 U/l), le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g)).....	59



Figure 3.5 Cinétique de l'élimination des TrOC (entre 0 et 4 h de contact) à 22 °C et pH 7, par la laccase (1000 U/l), le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g) .....	63
Tableau 3.1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés .....	31
Tableau 3.2 Gammes de concentrations des substrats pour la détermination des paramètres de Michaelis-Menten.....	39
Tableau 3.3 Différentes combinaisons de pH, de température et de temps de contact testées.....	41
Tableau 3.4 Activités de la combi-CLEA et rendements d'immobilisation <sup>a</sup> .....	43
Tableau 3.5 Paramètres cinétiques des enzymes libres avec les substrats spécifiques à 22 °C et pH 7 .....	45
Tableau 3.6 Paramètres cinétiques de la combi-CLEA avec les substrats spécifiques à 22 °C et pH 7 <sup>a</sup> .....	45
Tableau 3.7 Paramètres cinétiques des enzymes libres lors de l'élimination de l'acétaminophène seul en solution à 22 °C et pH 7 <sup>a</sup> .....	45
Tableau 3.8 Paramètres cinétiques des enzymes libres lors de l'élimination de l'acétaminophène en solution contenant 35 TrOC à 22 °C et pH 7 <sup>b</sup> .....	46
Tableau 3.9 Paramètres cinétiques de la combi-CLEA lors de l'élimination de l'acétaminophène seul en solution et en solution contenant 35 TrOC à 22 °C et pH 7 .....	46

## LISTE DES ACRONYMES, DES SYMBOLES ET DES SIGLES

ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ABTS <sup>•+</sup>	Radical cationique de l'ABTS
AINS	Anti-inflammatoires non stéroïdiens
AF	Acide formique
BAC	Boue activée conventionnelle
BPA	Bisphénol A
BCA	<i>BiCinchoninic acid</i> , acide bicinchonique
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , sérum-albumine bovine
CBH	Cellobiohydrolases
cc	Centimètre cube
CCE	Commission des communautés Européennes
CH <sub>4</sub>	Méthane
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregates</i> , agrégats d'enzymes réticulés
Combi-CLEA	<i>Combination of cross-linked enzyme aggregates</i> , Combinaison d'agrégats d'enzymes réticulés
CO <sub>2</sub>	Dioxyde de carbone
DBO	Demande biochimique d'oxygène
DCO	Demande chimique d'oxygène
FBR	<i>Fluidized bed reactor</i>
FPU	<i>Filter paper unit</i>
g	Gramme, force centrifuge relative
GLA	Glutaraldéhyde
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCl	Acide chlorhydrique
HLB	<i>Hydrophobic-lipophobic-balanced</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> , Chromatographie liquide à haute performance
H <sub>2</sub>	Dihydrogène (hydrogène moléculaire)
H <sub>2</sub> O	Eau
Kcat	Constante catalytique : vitesse maximale de transformation du substrat par masse d'enzyme
kDa	Kilodalton (1000 daltons)

K <sub>m</sub>	Constante de demi-vitesse de Michaelis-Menten
LC MS/MS	Chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem
LCPE	<i>Loi canadienne sur la protection de l'environnement</i>
LMS	<i>Laccase-mediator system</i>
Log K <sub>ow</sub>	Logarithme du coefficient de partage octanol/eau
MD-EMBR	<i>Membrane distillation-enzymatic bioreactor</i>
MeCN	Acétonitrile
MELCC	ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
MeOH	Méthanol
mg/ml	Milligramme par millilitre
MTCCC	<i>Microbial Type Culture Collection Centre (Inde)</i>
mV	Millivolt
m/v	Masse par volume
NaOH	Hydroxyde de sodium
ng/l	Nanogramme par litre
N <sub>2</sub>	Diazote (azote gazeux)
nm	Nanomètre
PCB	Polychlorobiphényles
PE	Perturbateurs endocriniens
PhACs	<i>Pharmaceutical active compounds</i>
ppb	<i>Part per billion</i>
PSP	Produits de soins personnels
PTFE	Polytétrafluoroéthylène (Téflon)
R	Coefficient de corrélation
tpm	Tour par minute
TrOCs	<i>Trace organic contaminants</i> , contaminants organiques en traces
U	Unité
UNEP	<i>United Nations Environment Programme</i> , Programme des Nations Unies pour l'environnement
UPLC	<i>Ultra performance liquid chromatography</i>
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
USGS	<i>United States Geological Survey</i>
UV-Vis	Rayonnements ultra-violet et visible

UV-B	Rayonnement ultra-violet de type B
$\mu\text{g/l}$	Microgramme par litre
$\mu\text{mole}$	Micromole ( $10^{-6}$ mole)
$V_{\text{max}}$	Vitesse maximale de Michaelis-Menten
WHO	<i>World Health Organization</i> , Organisation mondiale pour la santé
$\epsilon_{\text{max}}$	Coefficient d'extinction molaire (coefficient d'absorption molaire)
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celsius

## LEXIQUE

Agoniste	Un agent qui interfère avec un constituant spécifique de l'organisme (ex. : récepteur) et qui peut induire une réponse positive observable (ScienceDirect, 2019)
Antagoniste	Se dit d'un agent qui interagit avec un ou plusieurs récepteurs d'une molécule naturelle de l'organisme (le ligand endogène) en bloquant la capacité de ce(s) récepteur(s) d'interagir avec cette molécule naturelle et en diminuant ainsi l'effet physiologique de cette dernière (Lexique : Psychologie et santé, 2019)
Bioaccumulation	Processus d'augmentation durant le temps de la concentration d'une substance dans le corps d'un être vivant qui l'ingère régulièrement, ou qui vit dans un milieu qui en est contaminé (Olivier, 2017)
Bioamplification	Processus d'augmentation d'une substance par accumulation progressive à mesure que l'on monte dans la chaîne alimentaire (Olivier, 2017)
Catalyse enzymatique	Processus par lequel une enzyme accélère une réaction chimique, notamment en abaissant l'énergie d'activation de la réaction (Essigmann et Stubbe, 2013)
Effet cocktail	Effets d'addition, d'antagonisme ou de synergie dus à la co-exposition à plusieurs substances (Kortenkamp, 2007)
Isoenzyme (isozyme)	Différentes formes moléculaires d'une enzyme ayant des propriétés catalytiques similaires ou identiques (ScienceDirect, 2019)

Sélectivité (de l'enzyme)	Propriété d'un substrat indiquant à quel degré est lié et transformé par différentes enzymes. La meilleure mesure de la sélectivité est fournie par le ratio $k_{cat}/K_m$ . La sélectivité indique également la formation de certains produits au lieu d'autres (ex. : énantio-sélectivité, régiosélectivité) (Berg, Tymoczko et Stryer, 2002)
Spécificité (de l'enzyme)	Les enzymes transforment un ou des substrats dédiés (spécifiques) et catalysent habituellement une seule réaction ou un ensemble de réactions étroitement liées (Essigmann et Stubbe, 2013)
Substrat	Molécule qui après s'être liée au site actif de l'enzyme, est transformée en produit(s) (Essigmann et Stubbe, 2013)
Xénobiotique	Substance étrangère à un système vivant (Olivier, 2017)

## INTRODUCTION

Les progrès de la chimie de synthèse ont permis la production et la mise en marché en continu de produits chimiques conçus pour l'amélioration de la vie sur Terre. Par exemple, en 1928, la découverte et la concentration de la pénicilline ont permis à la médecine de faire un grand pas dans le traitement des infections d'origine bactérienne. Aussi, à la fin de la Deuxième Guerre mondiale, l'arrivée des pesticides organochlorés à l'image du dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT) fut perçue telle une avancée importante de l'agriculture et de la production alimentaire. Toutefois, au fil des décennies, la production, l'usage et le rejet massif de ces produits dans l'environnement ont fini par susciter des inquiétudes croissantes. En effet, bon nombre de produits chimiques rejetés dans l'environnement sont suspectés d'avoir des effets écologiques et sanitaires néfastes (Daughton et Ternes, 1999; Karam et Nicell, 1997).

Mus par la prise de conscience collective sur les problématiques environnementales liées à ces substances, les pouvoirs publics, les législateurs et la communauté scientifique se sont progressivement approprié le défi de résoudre ces problématiques. Globalement, deux niveaux d'intervention sont à considérer. En premier lieu, les législations tentent de limiter et de mieux encadrer la production, l'usage et le rejet des produits chimiques dans l'environnement. Deuxièmement, d'importants efforts scientifiques et technologiques se déploient et se focalisent sur le retrait des contaminants des matrices environnementales déjà affectées.

Il s'avère qu'une part significative des substances chimiques rejetées dans l'environnement finit ultimement sa course dans le cycle de l'eau (Daughton et Ternes, 1999; Verlicchi, Al Aukidy, et Zambello, 2012). Cette situation menace non seulement la qualité de l'eau, mais elle accentue aussi, au cours du temps, la pression en ce qui concerne la disponibilité de la ressource même. Cette pression se trouve exacerbée par les effets des changements climatiques, la croissance démographique, l'urbanisation croissante et l'émergence de nouveaux modes de vie davantage dispendieux en eau. Face à ces défis, la récupération et la réutilisation des eaux usées traitées constituent une avenue sérieuse à considérer (Fatta-Kassinos, Dionysiou et Kümmerer, 2016).

La décharge des effluents des stations d'épuration des eaux usées (STEP) dans l'environnement ainsi que l'épandage des biosolides pour l'amélioration des sols agricoles sont considérés comme des points d'entrée majeurs des contaminants organiques dans l'environnement (eaux, sols, etc.) (Barnes et al., 2008; Fent, Weston et Caminada, 2006; Jones-Lepp, Sanchez, Alvarez, Wilson et Taniguchi-Fu, 2012; Kolpin et al., 2002; Petrie, Barden et Kasprzyk-Hordern, 2015). En effet, plusieurs contaminants organiques présents en traces (typiquement de quelques ng/l à quelques µg/l) ont été détectés dans les effluents des STEP (Kolpin et al., 2002; Verlicchi et al., 2012). Parmi ces substances, les principales catégories représentées sont les

produits pharmaceutiques, les pesticides, les produits de soins personnels, les hormones ou encore les produits chimiques industriels. Leurs métabolites et des produits intermédiaires de transformation sont également détectés dans les eaux souterraines et les eaux de surface (Heberer, Reddersen et Mechlinski, 2002; Kolpin et al., 2002; Luo et al., 2014; Metcalfe, 2013).

Plusieurs techniques sont déployées pour l'enlèvement des xénobiotiques dans les eaux usées. Globalement, ces techniques se fondent en trois principales approches, soit les techniques biologiques, physiques et chimiques. De plus, l'association de plusieurs techniques permet de renforcer les performances épuratoires des traitements.

Par ailleurs, dans le contexte actuel où la protection et la restauration de l'environnement sont mises de l'avant, la recherche de technologies de décontamination à la fois efficaces, écologiques et économiquement rentables a mobilisé beaucoup d'efforts et d'importants moyens dans les pays occidentaux notamment. Ainsi, depuis quelques décennies, un certain nombre de travaux de recherche se sont focalisés sur l'utilisation de la catalyse enzymatique pour l'enlèvement des xénobiotiques des médias solides et aqueux de l'environnement (Cabana, Jiwan, et al., 2007; Cabana, Jones et Agathos, 2007; Karam et Nicell, 1997; Rao, Scelza, Scotti et Gianfreda, 2010; Tanaka et al., 2001).

Plusieurs éléments justifient l'intérêt croissant dont bénéficient les technologies enzymatiques et les efforts dédiés à leur développement. En effet, contrairement aux systèmes vivants tels que les bactéries, impliqués dans les procédés de traitement biologiques, les enzymes constituent des systèmes chimiques non vivants. Par conséquent, la catalyse enzymatique recèle plusieurs avantages intéressants comparativement à la catalyse microbienne. Ainsi, elle est capable d'atteindre des cinétiques réactionnelles élevées, et ce, à températures et pH modérés, sans que les enzymes subissent les effets de l'activité biologique des composés ciblés (de Cazes, Abejón, Belleville et Sanchez-Marcano, 2014). Aussi, certaines enzymes sont à la fois hautement sélectives et non spécifiques. Dès lors, elles peuvent transformer, d'une part, des substrats dédiés parmi plusieurs substrats similaires, et démontrer, d'autre part, des propriétés non spécifiques en ciblant plusieurs substrats différents. Les laccases sont un cas intéressant de ces types d'enzymes. Prises globalement, ces caractéristiques offrent une flexibilité d'utilisation des enzymes qui les rend compatibles et efficaces dans les matrices environnementales réelles (Rao et al., 2010). De plus, les enzymes peuvent être actives sur un large spectre de pH, de température et tolérer la salinité et les variations de concentrations des xénobiotiques dans les eaux usées (Karam et Nicell, 1997). Les enzymes peuvent aussi démontrer une faible sensibilité à la présence d'inhibiteurs du métabolisme microbien et aux changements des conditions du milieu (de Cazes et al., 2014; Karam et Nicell, 1997; Rao et al., 2010).



Comparativement aux traitements chimiques, la catalyse enzymatique offre des avantages appréciables. En effet, les enzymes sont biodégradables et s'avèrent tout aussi bien adaptées aux traitements des déchets de produits biodégradables (Karam et Nicell, 1997). De même, à l'opposé des dérivés agressifs (ex. : les organochlorés) formés lors des traitements chimiques tels que la chloration, la catalyse enzymatique génère des produits de transformation moins nocifs pour l'environnement (Couto et Toca-Herrera, 2006). Finalement, les traitements enzymatiques des effluents permettent une réduction significative des quantités de boues (potentiellement toxiques) produites lors des traitements des eaux usées (Karam et Nicell, 1997).

Il reste que certains facteurs handicapent l'utilisation des enzymes sous formes libres en procédés continus et la mise à l'échelle de l'approche par catalyse enzymatique pour l'enlèvement des contaminants organiques en traces (*trace organic contaminants* [TrOC]) dans les eaux usées. En effet, les enzymes demeurent encore onéreuses, sont solubles dans les médias aqueux et instables dans certaines conditions de stockage ou d'utilisation telles que le pH du milieu, les températures élevées, la présence de solvants organiques ou l'agitation mécanique (Sheldon, 2007a; Sheldon 2007b; Sheldon 2011; Hanefeld, 2013; Guauque Torres, Foresti et Ferreira, 2013). Afin de contourner ces obstacles, l'immobilisation enzymatique constitue un moyen simple, efficace et économique de construire des catalyseurs robustes, insolubles dans les milieux aqueux et résistants aux différents facteurs limitants évoqués ci-dessus (Sheldon, 2007a).

Au cours des dernières décennies, l'étude de la laccase a mobilisé beaucoup d'efforts. Ainsi, plusieurs recherches ont suggéré le potentiel de cette enzyme pour de nombreuses applications biotechnologiques et de décontamination, entre autres (de Cazes et al., 2014; Gianfreda et Rao, 2004). Pour leur part, les enzymes hydrolytiques sont présentées dans un certain nombre d'études comme des candidates intéressantes pour la gestion des déchets biodégradables, le traitement et la désinfection des eaux usées (Demarche, Junghanns, Nair et Agathos, 2012; Karam et Nicell, 1997).

L'objectif général de cette étude est de réaliser l'élimination d'un cocktail de TrOC par catalyse enzymatique dans un échantillon d'eau usée synthétique produite au laboratoire. Cinq groupes d'enzymes seront utilisés, à savoir une laccase (E.C. 1.10.3.2) de souche fongique et quatre enzymes hydrolytiques que sont une amylase (EC 3.2.1.1), une lipase (EC 3.1.1.3), une cellulase (EC 3.2.1...) et une protéase (EC 3.4...). Ces enzymes hydrolytiques se présentent sous forme d'un mélange en poudre grossière.

Selon un certain nombre d'études, les laccases ont démontré une efficacité pour la dégradation de composés modèles appartenant aux classes chimiques étudiées dans cette recherche. En effet, ces enzymes ont été utilisées avec succès dans le traitement d'effluents chargés de contaminants organiques tels que les perturbateurs endocriniens et les produits pharmaceutiques et de soins personnels (Cabana, Jones et al., 2007; Auriol et al., 2007; Asif, Hai, Singh, Price et Nghiem, 2017; Lloret et al., 2010). Quant aux hydrolases,

ces enzymes exhibent, en particulier, une bonne capacité à dégrader certaines classes de pesticides et d'antibiotiques (Karigar et Rao, 2011). Toutefois, la plupart des études portant sur l'élimination des contaminants organiques par catalyse enzymatique ont été réalisées, d'une part, avec une seule enzyme simultanément, et d'autre part, ces études ont ciblé un seul composé à la fois. Dans la présente étude, 22 composés en solution sont ciblés, respectivement avec la laccase libre et un mélange de quatre hydrolases sous forme libre. De plus, pour la première fois, cette étude s'attèle à la formation d'une combinaison d'agrégats d'enzymes réticulés (*combination of cross-linked enzyme aggregates* [combi-CLEA]) en associant cinq enzymes, soit une oxydoréductase et quatre hydrolases, et son application au traitement des contaminants organiques. Tels sont les principaux défis à relever dans le cadre de cette étude.

Afin d'atteindre l'objectif général ci-dessus, quatre objectifs spécifiques ont été établis. Premièrement, l'étude vise à déterminer le potentiel d'élimination des TrOC par la laccase et le mélange d'hydrolases sous formes libres. Pour ce faire, des tests d'élimination seront effectués avec ces enzymes dans l'eau usée synthétique. Ensuite, il sera question de former un catalyseur insolubilisé *via* la réticulation d'agrégats d'enzymes, avec la laccase et le mélange d'hydrolases. Le catalyseur ainsi préparé sera caractérisé en déterminant ses paramètres cinétiques tels que la vitesse maximale ( $V_{max}$ ) et la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ), en utilisant les substrats spécifiques et aussi l'acétaminophène comme modèle de substrat parmi les TrOC. De plus, la stabilité du catalyseur insolubilisé sera déterminée par rapport aux contaminants traités. Subséquemment, comme troisième objectif spécifique, il est prévu de déterminer le potentiel du catalyseur insolubilisé pour l'élimination des TrOC dans la même solution d'eau usée synthétique utilisée avec les enzymes libres. Enfin, l'étude vise à déterminer l'impact du pH, de la température et du temps de contact sur l'élimination des TrOC par les différents catalyseurs, sous formes libres ou insolubilisées.

Ce mémoire est structuré en quatre chapitres. Le chapitre 1 présente quelques classes de contaminants organiques présents en traces dans les eaux usées ainsi que leurs sources et voies de contamination de l'environnement. Certains des effets potentiels ou connus de ces substances sur les organismes aquatiques et les humains de même que quelques techniques appliquées pour leur enlèvement dans les eaux usées y sont aussi discutés. Finalement, un aperçu du cadre légal et réglementaire relatif à la problématique des TrOC dans l'environnement est présenté dans ce chapitre, avec la présentation de la situation en Europe, au Canada et au Québec.

Le chapitre 2 est consacré aux traitements par catalyse enzymatique des TrOC dans les eaux usées. Plus spécifiquement, les enzymes d'intérêt de cette recherche y sont présentées, à savoir la laccase et quatre enzymes hydrolytiques que sont l'amylase, la lipase, la cellulase et la protéase. Y sont également abordés,

les techniques d'immobilisation enzymatique ainsi que les avantages et inconvénients des catalyseurs formés à l'aide de ces techniques. En outre, quelques résultats intéressants d'études portant sur le traitement des contaminants organiques dans les eaux usées avec ces différents catalyseurs, utilisés comme enzymes libres ou sous formes insolubilisées, sont mis en évidence.

Le chapitre 3 de ce mémoire est consacré à un cas d'application des enzymes d'intérêt de cette étude au traitement des TrOC. Ainsi, le potentiel de la laccase libre, du mélange d'hydrolases libres et de la combi-CLEA formée à partir de ces enzymes, pour l'enlèvement des TrOC est déterminé avec l'effluent synthétique, dans un traitement de type séquentiel. Tous les catalyseurs sont également caractérisés en déterminant leurs paramètres cinétiques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ). De plus, leur stabilité a été évaluée après leur exposition aux contaminants en déterminant leurs activités résiduelles avec les substrats spécifiques. Aussi, pour chaque enzyme, le rendement d'immobilisation de la combi-CLEA a été déterminé par rapport aux activités massiques des enzymes libres et de la combi-CLEA. Finalement, l'impact des conditions du milieu tels que le pH, la température, et le temps de contact sur l'élimination des contaminants est déterminé dans ce chapitre.

Enfin, le chapitre 4 présente les conclusions de cette étude et quelques recommandations. Quelques suggestions sur les perspectives du thème de l'étude sont également formulées.

# 1 REVUE DE LITTÉRATURE

Cette revue de littérature présente quelques classes de contaminants organiques en traces, leurs sources et voies de contamination de l'environnement. Les effets potentiels ou connus des TrOC sur les organismes aquatiques et les humains, de même que quelques techniques appliquées pour leur élimination dans les médias aqueux sont aussi décrits. Par ailleurs, un aperçu du cadre légal et réglementaire relatif aux TrOCs, en Europe, au Canada et au Québec est exposé.

## 1.1 Composés organiques en traces

Les contaminants organiques en traces réfèrent à un large éventail de composés chimiques naturels ou anthropiques, leurs métabolites et les produits de leurs transformations, détectés en concentrations de quelques ng/l à quelques µg/l dans les milieux aqueux (Hai et al., 2014; Luo et al., 2014). Ces composés peuvent être répartis en plusieurs catégories suivant leurs classes chimiques, le type d'usage, le type d'effets, les sources et les voies d'exposition (Belgiorno et Rizzo, 2012). Les sous-sections suivantes décrivent quelques classes importantes de TrOC.

### 1.1.1 Perturbateurs endocriniens

Un perturbateur endocrinien (PE) est un composé chimique exogène, ou un mélange de composés chimiques qui interfèrent avec un aspect quelconque de l'action hormonale chez les animaux ou les plantes. En altérant les fonctions du système endocrinien, ces substances peuvent du coup, provoquer des effets nocifs sur la santé des organismes vivants entiers, sur leur progéniture ou sur une partie de leurs populations (Cabana, Jiwan, et al., 2007; Raghav, Eden, Witte, Polle et Mitchell, 2013; Vos et al., 2000).

Selon la Commission des Communautés Européennes (CCE, 2001), les perturbateurs endocriniens peuvent être classés en deux principales catégories, soit :

- Les hormones naturelles présentes dans l'organisme humain ou animal telles que les œstrogènes (œstrone (E1), 17β-estradiol (E2), estriol (E3)), les progestérones, les testostérones et les phyto-estrogènes que sont les isoflavonoïdes et le coumestrol, présentes chez certaines plantes (Lema Rodicio et al., 2014).
- Les substances de synthèse, représentant de loin la plus grande proportion de PE connus, comprennent plusieurs classes chimiques :
  - Les composés polychlorés, dérivés de la production industrielle ou de substances telles que les dioxines polychlorées ou les biphényles polychlorés (ex. : les dioxines, les furanes, le 2,2',5,5'-Tétrachlorobiphényle (PCB 52));

- Les composés organochlorés présents dans les pesticides aujourd’hui majoritairement bannis (ex. : le DDT et son métabolite le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE), le dieldrine, le chlordane);
- Certains pesticides actuels (ex. : le chlorpyrifos, le perméthrine, le diazinon);
- Les organostanniques, qui se retrouvent dans les agents antisalissures de peinture (ex. : l’hydrure de tributylétain, l’oxyde de bis(tributylétain) (TBTO));
- Les alkyl-phénols; ce sont des surfactants ou leurs métabolites présents dans certains types de détergents utilisés pour l’enlèvement d’huiles et de graisses, dans les plastiques et dans la formulation des pesticides (ex. : le nonylphénol);
- Les substances retardatrices de flamme qu’on retrouve dans le rembourrage des meubles, dans les sièges et équipements d’automobiles, les tapis de sol ou les équipements électroniques tels que les postes de télévision ou les ordinateurs (ex. : le diphenyléther polybromé (PBDE 47));
- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Ils proviennent des sources de combustion telles que les incinérations, les cheminées, les réchauds, les brûleurs, la fumée de cigarette, les échappements d’automobiles etc., mais également de la pollution et le transport atmosphériques (ex. : le benzo[*a*]pyrène);
- Les phtalates utilisés dans la production de plastifiants (ex. : *diethylhexyl phthalate* (DEHP), *benzyl octyl phthalate* (B79P));
- Les hormones stéroïdiennes synthétiques, composés chimiques inhibiteurs de l’ovulation à la base des pilules de contraception (ex. : le 17 $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2));
- Les phénols et autres composés phénoliques entrant dans la fabrication des produits cosmétiques, de soins personnels, des désinfectants et des plastiques (ex. : l’*o*-phénylphénol, le bisphénol A, les parabènes, le 2-chlorophénol). (Dodson et al., 2012; Labelle, 2000).

Globalement, il est admis que les PE agissent minimalement de trois manières possibles. Aussi, peuvent-ils stimuler ou inhiber la sécrétion des hormones naturelles, avoir un effet agoniste ou antagoniste en interférant avec le récepteur hormonal ou perturber la synthèse, le transport et le métabolisme des hormones (Ishibashi et al., 2004; Jobling et al., 2003; Mills et Chichester, 2005; Soto, Justicia, Wray et Sonnenschein, 1991). Par ailleurs, différents types de perturbations sont associés aux PE. De fait, les PE de type oestrogénique perturbent l’action des œstrogènes naturelles, les composés androgéniques miment ou bloquent l’activité de la testostérone naturelle tandis que les substances thyroïdiennes synthétiques peuvent déséquilibrer le fonctionnement des glandes thyroïdiennes (Snyder, Vanderford, Pearson, Quiñones et Yoon, 2003).

Le bisphénol A (BPA), le triclosan (5-chloro-2(2,4-dichloro-phénoxy) phénol) (TCS), le 4-nonylphénol (NP) et le 17- $\alpha$ -éthynylestradiol (EE2) sont quelques exemples de PE fréquemment détectés dans les eaux usées (Kolpin et al., 2002; Spina et Varese, 2016).

Plusieurs désordres fonctionnels sont associés à l'exposition chronique aux PE, et ce même, en concentrations à l'état de traces. Chez un sujet mâle adulte par exemple, l'oligospermie, les cancers testiculaires et l'hyperplasie prostatique sont quelques dysfonctionnements suspectés. Chez les femelles adultes, l'adénocarcinome vaginale, les perturbations de l'ovulation, les cancers de seins et les fibromes utérins figurent parmi les dysfonctionnements dont les PE sont suspectés être responsables. En outre, les désordres du fonctionnement de la thyroïde et du métabolisme osseux, l'obésité, le diabète, de même que les mutations génétiques sont d'autres dysfonctionnements potentiels associés à l'exposition aux PE. (Auriol, 2007; Garcia-Morales et al., 2015; Labelle, 2000)

### **1.1.2 Produits pharmaceutiques**

En médecine, un médicament est toute substance naturelle ou synthétique possédant un potentiel curatif ou préventif des maladies et celui d'améliorer la condition physique ou mentale (*World Health Organization* [WHO], 1994). Afin de remplir leurs fonctions, les médicaments possèdent des propriétés topiques et sont dotés de principes actifs ciblant des sites spécifiques où s'exercent leurs actions biologiques (Green et al., 2004; WHO, 2011). Particulièrement, en raison de leur polarité (Clara et al., 2005), plusieurs de ces molécules sont hydrophiles ( $\log K_{ow} < 3,2$ ). Par ailleurs, celles-ci exhibent une faible volatilité. Ces différentes propriétés expliquent notamment la présence préférentielle des résidus de produits pharmaceutiques dans les phases aqueuses de l'environnement (Daughton et Ternes, 1999; Fent et al., 2006). En outre, les médicaments sont conçus de façon à demeurer stables et biologiquement actifs assez longtemps dans l'organisme afin de produire les effets souhaités (Deziel, 2014). Ainsi, couramment, les rejets de médicaments se présentent sous forme de mélanges des molécules initiales et de leurs métabolites (Boxall et al., 2012; Suárez, Carballa, Omil et Lema, 2008; Ternes, Joss et Siegrist, 2004; Zhang, Geißen et Gal, 2008). De plus, les médicaments sont susceptibles de persister dans l'environnement (Clara et al., 2005; Radjenovic, Petrovic et Barceló, 2007). Finalement, dans les eaux usées traitées ou non, les résidus de médicaments se retrouvent en une combinaison des molécules initiales, des métabolites et des dérivés de biodégradation, de photolyse ou d'hydrolyse (Petrovic, 2003; Radjenovic, Petrovic et Barceló, 2007; Sinclair et Boxall, 2003).

La croissance puis le vieillissement de la population occidentale ont induit au cours des décennies une augmentation conséquente des quantités de médicaments produits et consommés dans ces parties du monde. Les volumes de rejets de médicaments et ceux disposés de manière régulière ou inappropriée dans l'environnement, suivent également les mêmes tendances (WHO, 2011; Haroune, 2016). En 2014, la production mondiale annuelle de médicaments était estimée à des centaines de milliers de tonnes avec plus de 4 000 molécules disponibles (de Cazes et al., 2014). En général, ces molécules sont composées des

médicaments d'ordonnance, des produits en vente libre, mais aussi des drogues et des médicaments illicites (Jones-Lepp et al., 2012).

Entre 1980 et 1990, plusieurs classes de produits pharmaceutiques dont des antibiotiques, des fibrates, des antidépresseurs, des analgésiques et des bêta-bloquants (Daughton et Ternes, 1999; Kolpin et al., 2002) ont été détectées dans les eaux usées, les rivières et les eaux souterraines, en Europe et en Amérique du Nord (Buser, Poiger et Müller, 1999; Kolpin et al., 2002; WHO, 2011). Certaines de ces molécules ont été également détectées dans l'eau potable, en Allemagne, en Hollande, en Italie (Huerta-Fontela, Galceran et Ventura, 2011) et au Canada (Husk et al., 2019). Aux États-Unis, entre 1999 et 2000, une étude de reconnaissance a été réalisée par *United States Geological Survey* (USGS) sur la présence des contaminants organiques dans les cours d'eau de 30 États. Celle-ci a permis de détecter la présence de plusieurs produits pharmaceutiques (Kolpin et al., 2002). Le Canada n'échappe pas à la problématique de la présence des composés pharmaceutiques dans les eaux usées et l'eau potable. En effet, ces derniers ont été détectés dans les eaux usées traitées et non traitées des usines de traitement des effluents municipaux (Metcalf, 2013) et, en moindres concentrations, dans l'eau potable (Metcalf, 2014). Au Québec, une récente étude sur la présence des contaminants organiques a ciblé 17 communautés rurales du centre-sud de la province tirant leurs ressources en eau des eaux souterraines. Effectivement, les résultats ont prouvé la présence de 9 produits pharmaceutiques (en concentration de 0,030 µg/l à 1,848 µg/l) dans l'eau potable. La caféine et le naproxène ont été les plus détectés, avec respectivement 29 % et 21 % d'occurrence dans les échantillons testés. De plus, et pour la première fois, des occurrences du produit cancérigène, la cyclophosphamide et du fongicide thiabendazole ont été détectées. (Husk et al., 2019)

Les risques toxicologiques liés à l'exposition chronique aux composés pharmaceutiques à faibles doses restent encore insuffisamment déterminés (Boxall et al., 2012; Fent et al., 2006; Jones-Lepp et al., 2012; WHO, 2011). Néanmoins, certains auteurs prétendent que leurs concentrations dans le cycle de l'eau s'avèrent très inférieures aux doses sublétales pour les humains (Fent et al., 2006; Metcalf, 2013). En conséquence, ceux-ci suggèrent que les risques pour la santé humaine demeurent faibles (Fent et al., 2006). Cependant, en raison de leur stabilité, les composés pharmaceutiques sont capables de persister, de bioaccumuler dans l'environnement (Clara et al., 2005; Radjenovic et al., 2007) et de bioamplifier dans la chaîne alimentaire (Olivier, 2017). De plus, dans les eaux usées, d'autres substances chimiques peuvent se combiner aux produits pharmaceutiques. Ainsi, même à l'état de trace, ces mélanges de composés chimiques sont susceptibles de générer des interactions complexes telles que les effets d'addition (Jobling, Reynolds, White, Parker et Sumpter, 1995), d'antagonisme ou de synergie : c'est l'effet cocktail.

Contrairement aux effets toxicologiques, les effets écotoxicologiques des produits pharmaceutiques chez les organismes aquatiques sont davantage documentés (Jobling, Nolan, Tyler, Brighty et Sumpter, 1998).

Le rejet continu des effluents dans l'habitat de ces êtres justifie un suivi constant de ce dernier. Des travaux de surveillance environnementale en France, en Italie, en Grèce et en Suède ont montré que l'exposition chronique des bactéries, des microcrustacés, des algues et des poissons à la carbamazépine, à l'acide clofibrique ou au diclofénac, présente des risques importants pour ces derniers (Ferrari, Paxéus, Giudice, Pollio et Garric, 2003). Par exemple, David et Pancharatna (2009) ont montré des effets négatifs de l'acétaminophène sur le poisson zèbre *Danio rerio*. Il a été également montré que l'acide méfénamique et l'ibuprofène seraient responsables de la perturbation du système hormonal chez ce poisson à partir d'une concentration de 10 µg/l, et ce, indépendamment du sexe (Ji et al., 2013). Par ailleurs, le bézafibrate serait capable de provoquer une altération de l'ADN chez le poisson zèbre à des concentrations aussi petites que 50 ng/l (Rocco, Frenzilli, Fusco, Peluso et Stingo, 2010), tandis que le gemfibrozil aurait exhibé le potentiel de perturbation endocrinienne chez le poisson doré *Carassius auratus* (Mimeault et al., 2005). Dans la région densément peuplée de Potomac aux États-Unis, l'étude de l'USGS mentionnée précédemment a révélé la présence d'œufs dans les testicules des mâles d'une espèce de poisson. Cette anomalie serait corrélée à l'utilisation intensive de produits pharmaceutiques et de pesticides dans la région (Wu et al., 2009).

Sur un tout autre aspect, l'exposition continue des microorganismes aquatiques aux antibiotiques, due au rejet massif des effluents avec ces molécules dans les milieux aquatiques, serait responsable de l'émergence d'une résistance à ces produits chez certains de ces organismes. Corollairement, cette résistance est source d'une nouvelle problématique (Ventola, 2015; Al-Bahry, Mahmoud, Paulson et Al-Musharafi, 2015; Metcalfe, 2013; Suzuki, Pruden, Virta et Zhang, 2017), quant à l'efficacité à long terme des antibiotiques actuels pour le traitement de certaines infections d'origine bactérienne.

### 1.1.3 Pesticides

Selon l'*American National Institute of Environment and Health Sciences* (NIEHS), un pesticide désigne toute substance ou mélange de substances utilisées pour tuer, repousser ou contrôler certains aspects de la vie des animaux ou des plantes considérés comme nuisibles. Font partie des pesticides, les herbicides, les insecticides, les fongicides, les agents antimicrobiens, les désinfectants, les agents conservateurs de bois et de matériaux, les algicides ainsi que les répulsifs d'animaux et d'insectes.

L'usage des pesticides n'est pas récent. Les Romains antiques éliminaient déjà les parasites en brûlant du soufre et maîtrisaient la pousse d'herbes grâce au sel (Delaplane, 1996). Après la Deuxième Guerre mondiale, la croissance de la population mondiale a fait naître de nouveaux défis en termes de besoins alimentaires et d'émergence de nouveaux modes de vies. Ainsi, les besoins d'amélioration des rendements agricoles avaient alors entraîné, entre autres, le développement d'une nouvelle génération de pesticides



organochlorés populaires tels que le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le  $\beta$ -hexachlorocyclohexane ( $\beta$ -HCH), l'aldrine, le dieldrine, l'endrine et l'acide (2,4-D) dichlorophénoxyacétique (Delaplane, 1996). La popularité de ces nouveaux insecticides résidait dans leur caractère non sélectif, c'est-à-dire, leur large spectre d'action. Cependant, dans les années 1950 et 1960 déjà, il était devenu évident que l'usage intensif et incontrôlé des pesticides pourrait comporter des risques importants au système biologique des organismes aquatiques et des humains (Fent et al., 2006; Raghav et al., 2013). La perturbation du système endocrinien est l'un des risques majeurs associés à l'exposition aux pesticides. En fait, des effets nuisibles neurotoxiques et perturbateurs du système endocrinien ont été observés. Aussi, des impacts négatifs sur le système reproducteur tels que la dégradation de l'ADN ont été rapportés chez des organismes aquatiques (Salazar-Arredondo, Solís-Heredia, Rojas-García, Hernández-Ochoa et Quintanilla-Vega, 2008).

#### **1.1.4 Produits de soins personnels**

Les produits de soins personnels (PSP) sont composés d'articles d'hygiène et de soins quotidiens tels que les savons, des dentifrices, les crèmes solaires, les désinfectants, les désodorisants, etc. Ces produits sont utilisés en quantités importantes à travers le monde. Plusieurs ingrédients actifs tels que les parfums (ex. : muscs nitrés et polycycliques), les filtres UV (ex. : le 3-(4 méthylbenzylidène)-d-l-camphre, le 3-méthylbenzylidène, etc.) et les conservateurs (ex. : parabènes ou les dérivés d'izothiazolinone) entrent dans la formulation des PSP. Contrairement à la majorité des produits pharmaceutiques, la plupart des PSP sont d'usage externe. Certains d'entre eux, tels que les parfums et les crèmes solaires, peuvent dès lors, être directement relâchés dans l'environnement, par exemple, dans les eaux de baignade ou dans l'atmosphère par volatilisation. Ils échappent ainsi aux traitements réguliers des STEP (Ternes, et al., 2004). D'autres rejoignent directement les systèmes d'égouts et les eaux usées suite à leur usage pour les toilettes, les bains et les soins cosmétiques.

Globalement, les PSP reçoivent moins d'attention que les pesticides et les produits pharmaceutiques par exemple, et leurs effets sont peu connus sur les organismes non ciblés. Or, certains d'entre eux sont susceptibles de présenter des propriétés et des effets similaires à ceux associés aux pesticides et aux produits pharmaceutiques. Les parfums par exemple, sont ubiquitaires dans l'environnement, persistants et susceptibles de bioaccumuler. Par ailleurs, les effets toxicologiques associés à ces produits, leurs dérivés et sous-produits peuvent s'avérer plus importants que ceux attendus. (Daughton et Ternes, 1999) Par exemple, l'acide-2-phénylbenzimidazole-5-sulfonique et le 2-phénylbenzimidazole, deux ingrédients de la crème solaire, seraient capables d'affecter la rupture d'ADN en cas d'exposition aux rayons UV-B (Stevenson et Davies, 1999).

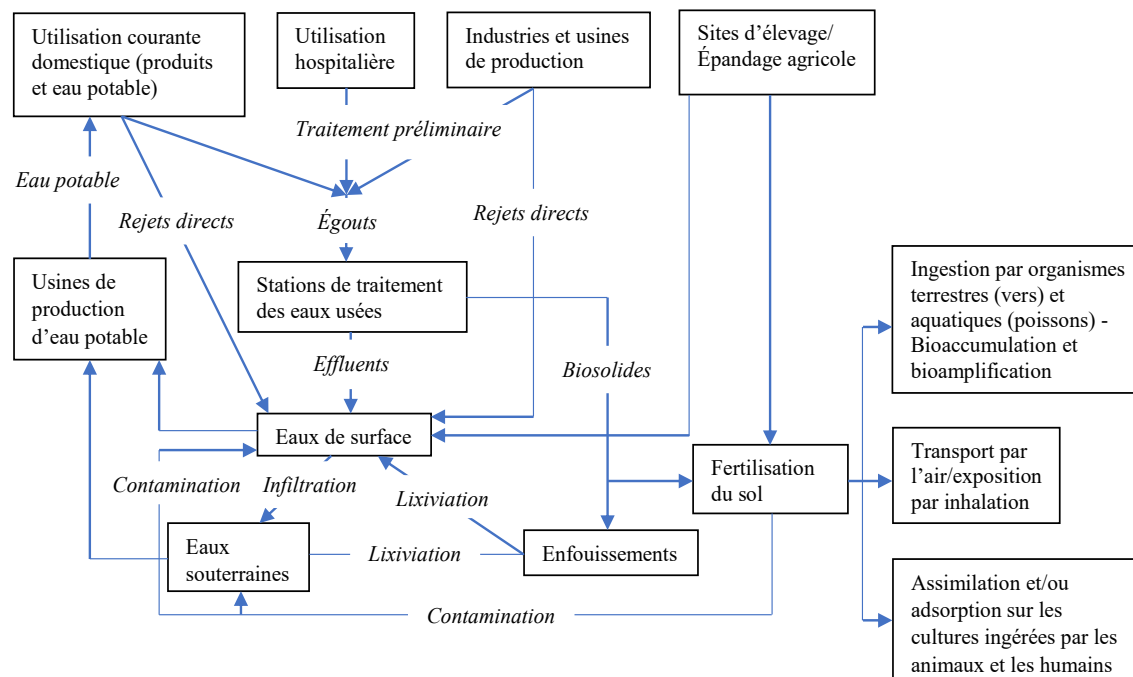
De même, le triclosan, un bactéricide utilisé dans la fabrication des dentifrices, des détergents et des vêtements de sport (Adolfsson-Erici, Pettersson, Parkkonen et Sturve, 2002) est suspecté pour son potentiel de perturbation du système endocrinien. Cette substance est fréquemment détectée dans les eaux d'égout, les effluents des STEP et les eaux de surface (Bester, 2003; Kolpin et al., 2002; Lindström et al., 2002).

## **1.2 Sources et voies de contamination de l'environnement**

La grande diversité des sources et des voies de pénétration des TrOC dans l'environnement rend leur suivi complexe (Figure 1.1). En général, deux types de sources sont clairement identifiables, soit les sources ponctuelles et les sources diffuses (Geissen et al., 2015). En ce qui concerne les sources ponctuelles, les effluents provenant des STEP constituent une des principales voies d'entrée des TrOC dans l'environnement (Barnes et al., 2008; Fent et al., 2006; Jones-Lepp et al., 2012; Kemper, 2008; Kolpin et al., 2002; WHO, 2011). De même, l'amendement des sols agricoles avec les biosolides (Kolpin et al., 2013), l'épandage de pesticides et les rejets d'eaux usées industrielles (Fent et al., 2006) constituent d'autres voies de contamination directes et *via* les STEP des eaux de surface et des eaux souterraines. De plus, les sites d'élevage et de pisciculture génèrent également des résidus chargés de composés chimiques tels que les antibiotiques et les additifs d'alimentation du bétail (Fent et al., 2006; Gaw, Thomas et Hutchinson, 2014; Kemper, 2008; Wu et al., 2009). La contamination diffuse quant à elle, s'avère plus difficile à circonscrire. Cependant, dans cette catégorie, les eaux de lixiviation des lieux d'enfouissement, le ruissellement agricole et les rejets inappropriés des restes de médicaments et les non-consommés constituent des sources potentielles de contamination (Fent et al., 2006).

## **1.3 Aspects réglementaires**

En raison de leurs faibles concentrations dans les médias aqueux, il existe aujourd'hui encore une certaine incertitude quant aux effets néfastes des TrOC. Par exemple, lorsque les produits pharmaceutiques ou les produits de soins personnels sont utilisés pour des besoins spécifiques, ils ne sont pas perçus comme des substances dangereuses. Cependant, leurs effets sur les organismes non ciblés sous exposition chronique peuvent s'avérer nuisibles. Pour ces raisons, la question de la réglementation des TrOC avec les instruments réglementaires existants ou nouveaux reste un débat encore controversé (Hochstrat, Schlosser, Corvini et Wintengs, 2015). En général, les TrOC en tant que tels ne font pas l'objet d'encadrements légaux ou réglementaires spécifiques. Toutefois, en fonction des classes de composés chimiques ciblées ou des matrices de l'environnement à protéger, différents règlements peuvent les viser.



**Figure 1. 1 Sources et voies de contamination de l'environnement par les TrOC** (inspiré de Raghav et al., 2013, p. 4).

Dans la Communauté Européenne, la protection des eaux de surface et des eaux souterraines est encadrée par des règlements communautaires établis à travers la *Directive-cadre sur l'eau (2000/60/EC)*. Cette directive décrit la définition de certaines substances (nocives) en fonction de leurs statuts chimiques. Elle établit également les mesures visant le contrôle de leur décharge dans l'environnement aquatique. La *Directive 2008/115/EC* sur les normes environnementales et la *Directive 2006/118/EC* sur la protection contre la pollution et la détérioration des eaux souterraines constituent les directives les plus pertinentes issues de la *Directive-cadre sur l'eau*. Quant à la *Directive 91/27/EEC* sur le traitement des eaux usées urbaines, elle ne mentionne guère d'exigences spécifiques sur les TrOC et ne crée finalement pas de clauses exécutoires. Au niveau national, la plupart des pays européens ne disposent pas de règlements contraignants visant en particulier la minimisation de la décharge des TrOC avec les eaux usées dans l'environnement. Seule la Suisse a introduit en 2014 des exigences dans sa *Loi sur la Protection de l'eau*, requérant un traitement avancé des eaux usées qui cible l'enlèvement des micropolluants. (Hochstrat et al., 2015)

Au Canada, différents aspects légaux et réglementaires traitant de la protection de l'environnement et le développement durable relèvent de la compétence partagée entre les gouvernements fédéral, provinciaux et territoriaux, mais aussi de celle des instances municipales. De façon générale, la loi encadre d'une part, la

production, le transport et l'utilisation des substances chimiques, et d'autre part, les seuils de rejet ou de présence tolérés dans l'environnement. Par conséquent, un certain nombre de TrOC peuvent se retrouver réglementés. Par exemple, en ce qui a trait aux pesticides, le gouvernement fédéral est responsable de l'homologation, de l'étiquetage et de leur mise en marché, par l'entremise de la *Loi sur les produits antiparasitaires* (L.R.C., c. P-9). De son côté, le gouvernement du Québec est garant des aspects plus utilitaires des pesticides, tels que la vente, l'usage, l'entreposage, le transport et l'élimination. (Tellier, 2006) Pour leur part, les municipalités ont, dans plusieurs provinces, le pouvoir d'édicter des réglementations plus poussées, en particulier quant à l'utilisation des pesticides en milieu urbain, en tenant compte de leurs particularités locales. Au Québec, le *Règlement sur la qualité de l'eau potable* (chapitre Q-2, r. 40) prescrit des normes et des contrôles de la qualité pour l'eau destinée à la consommation humaine. Particulièrement, ce règlement fait obligation à certains réseaux de distribution d'eau de respecter des normes relatives aux substances organiques, dont les pesticides (Ministère de l'environnement et de la lutte contre les changements climatiques [MELCC], 2019).

Dans la *Loi canadienne sur la protection de l'environnement* (LCPE), des dispositions précises sont édictées en vue de la collecte, de l'évaluation et de la gestion des données nécessaires pour gérer les substances toxiques, qu'il s'agisse de produits chimiques ou d'organismes vivants. En ce qui concerne les produits chimiques, le ministre de l'Environnement et le ministre de la Santé établissent une catégorisation des quelque 23 000 substances fabriquées, importées ou utilisées au Canada, à surveiller ou à évaluer. Sur ce nombre, le processus de catégorisation a déterminé la nécessité de procéder à une évaluation détaillée d'environ 4 300 substances. Ces dernières sont soupçonnées d'être intrinsèquement toxiques pour les humains ou pour l'environnement, d'être persistantes ou bioaccumulables et de présenter le plus fort risque d'exposition pour les Canadiens. L'évaluation de ces substances a été confiée au programme dénommé *Plan de gestion des produits chimiques* (PGPC). Ce programme a pour vocation de protéger les Canadiens et leur environnement contre l'exposition à des substances chimiques toxiques. Parmi les substances d'intérêt prioritaire surveillées par le PGPC entre 2017 et 2018, figuraient les polybromodiphényléthers (PBDE), l'hexabromocyclododécane (HBCD), les produits ignifuges à base d'esters organophosphatés (EOP) et les produits ignifuges halogénés sans PBDE, les phtalates, les diphenylamines substituées, les composés perfluorés et autres substances polyfluoroalkyliques et perfluoroalkyliques, les siloxanes, le triclosan, le bisphénol A, le nonyphénol et ses dérivés éthoxylés (NP/NPE), les sels de chlorhexidine, les phénols encombrés, les thiocarbamates, les paraffines chlorées à chaîne courte, etc..(Environnement Canada, 2019)

## **1.4 Aperçu de quelques techniques de traitements des TrOC**

Les techniques appliquées pour l'enlèvement des TrOC dans les eaux usées peuvent être regroupées en trois principales approches, à savoir les techniques physiques (ex. : filtration membranaire), les techniques biologiques (ex. : biodégradation) et les procédés d'oxydation avancés (PAO) (ex. : ozonation) (Liu, Kanjo et Mizutani, 2009).

### **1.4.1 Biodégradation**

La biodégradation des TrOC dépend de la présence et de la concentration de la biomasse, des propriétés des contaminants, mais aussi de la configuration des unités de traitement tout comme des paramètres opératoires (pH, température, temps de rétention hydraulique, etc.) (Verlicchi et al., 2012). La biodégradation et l'adsorption sur biosolides sont considérées comme deux mécanismes prépondérants associés à l'enlèvement des TrOC dans les traitements biologiques (Verlicchi et al., 2012). D'après Lema Rodicio et al. (2014), les techniques de biodégradation représentent actuellement l'approche la plus rentable économiquement. Dans cette catégorie, la technique de la boue activée conventionnelle (BAC) très répandue dans les UTEU, permet l'élimination partielle de contaminants récalcitrants, en plus de réduire la DBO, la DCO, les pathogènes et d'améliorer les propriétés organoleptiques des effluents traités.

### **1.4.2 Procédés d'oxydation avancés**

Les procédés d'oxydation avancés (PAO) font appel à l'usage de réactifs chimiques. Globalement, ils se déroulent en deux étapes, soit la production puis l'utilisation de puissants oxydants (radicaux hautement réactifs) pour amorcer des réactions d'oxydo-réduction conduisant ultimement à la transformation en sous-produits organiques ou à la minéralisation des contaminants organiques (Lema Rodicio et al., 2014). La combinaison de plusieurs types de PAO permet d'accroître les rendements de ces traitements. Ainsi, parmi les nombreuses techniques établies ou en développement, les couplages des traitements de type peroxyde d'hydrogène/ozone ( $H_2O_2/O_3$ ), Ozone/Irradiation Ultraviolet ( $O_3/H_2O_2/UV$ ) et peroxyde d'hydrogène/Irradiation Ultraviolet ( $H_2O_2/UV$ ) sont couramment utilisés (Brar, 2018). Cependant, en général, ces traitements s'avèrent davantage efficaces s'ils sont utilisés en traitement tertiaire ou de polissage. Ils requièrent donc presque toujours un prétraitement des effluents en vue de l'enlèvement des solides en suspension, des inhibiteurs de radicaux et des composés organiques ou ions compétiteurs (Hai et al., 2014). De plus, la forte utilisation de produits chimiques, la dépense énergétique élevée, la formation de produits dérivés toxiques, la complexité des technologies ainsi que les coûts associés (ex. : la production et le stockage de l'ozone et du peroxyde d'hydrogène) sont d'autres contraintes majeures associées aux PAO (Fatta-Kassinos et al., 2016; Hai et al., 2014).

## **2 ENZYMES À L'ÉTUDE**

Depuis quelques décennies, certaines recherches se focalisent sur l'utilisation des procédés enzymatiques comme une approche écologique prometteuse pour la décontamination de l'environnement (Karam et Nicell, 1997; Spina et Varese, 2016). Plusieurs éléments soutiennent l'intérêt croissant dont bénéficient les enzymes. En effet, contrairement aux systèmes vivants intervenant dans les procédés biologiques classiques, les enzymes forment des systèmes chimiques non vivants. Les enzymes permettent d'atteindre des cinétiques réactionnelles élevées, et ce, en conditions modérées (ex. : pression atmosphérique, température ambiante, pH modérés, médias aqueux, etc.). De plus, elles ne sont pas affectées par l'activité biologique des composés ciblés. (de Cazes et al., 2014; Rao et al., 2010) Par ailleurs, les enzymes exhibent une faible sensibilité aux inhibiteurs du métabolisme microbien (de Cazes et al., 2014; Nicell, 2001; Rao et al., 2010). Les enzymes extracellulaires sont capables d'agir sur une plage étendue de pH, de température, de concentration des contaminants en plus de présenter une certaine résistance à la salinité des milieux (Karam et Nicell, 1997). Pareillement, certaines enzymes sont à la fois hautement sélectives et versatiles. Elles peuvent ainsi transformer, d'une part, des substrats dédiés parmi plusieurs substrats similaires, et démontrer d'autre part, des propriétés non spécifiques en ciblant plusieurs substrats. Ces caractéristiques offrent une flexibilité d'utilisation des enzymes qui les rend potentiellement compatibles avec les médias environnementaux réels (Rao et al., 2010). Étant elles-mêmes des substances biodégradables, les enzymes s'avèrent bien adaptées aux traitements des déchets de produits biodégradables (Karam et Nicell, 1997). Finalement, la catalyse enzymatique génère des produits de transformation moins nocifs pour l'environnement (Couto et Toca-Herrera, 2006), à l'opposé des dérivés parfois toxiques produits lors des traitements chimiques.

Les enzymes extracellulaires comprennent plusieurs familles d'oxydoréductases et d'hydrolases. Ces deux grands groupes d'enzymes ont montré la capacité de transformer des substances polymériques en produits partiellement dégradés ou oxydés, susceptibles d'être facilement digérés par les cellules (Gianfreda et Rao, 2004). Aussi, plusieurs contaminants persistants tels que les asphaltènes, les polychlorobiphényles (PCB), les polychlorophénols, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été efficacement transformés par des oxydoréductases et des hydrolases secrétées par des champignons, des plantes ou des bactéries (Gianfreda, Mora et Diez, 2006).

### **2.1 Facteurs affectant l'enlèvement des TrOC par les enzymes**

Plusieurs facteurs déterminent et influencent les mécanismes d'élimination des TrOC par les enzymes. Parmi ceux liés aux substances transformées elles-mêmes, leurs propriétés physico-chimiques apparaissent comme un facteur-clé. À cela, s'ajoutent les conditions du milieu, en l'occurrence la concentration des

contaminants, le pH et la température, qui peuvent notamment influencer les cinétiques des réactions d'élimination (Wijekoon, 2015). En ce qui concerne les propriétés physico-chimiques des contaminants, la structure moléculaire (ex. : la présence de noyaux aromatiques), l'hydrophobicité et la présence de groupes fonctionnels donneurs ou accepteurs d'électrons sont quelques éléments susceptibles d'influencer leur élimination (Tadkaew, Hai, McDonald, Khan et Nghiem, 2011). Des essais portant sur l'élimination d'un cocktail de contaminants organiques avec la laccase dans un bioréacteur membranaire ont révélé des taux d'élimination variés. Par exemple, les composés modérément hydrophobes, mais possédant de forts groupes accepteurs d'électrons tels que les fonctions cyanure (-CN), nitro (-NO<sub>2</sub>), carbonyle (-COR), carboxylique (-COOH) et halogène (-X) sont faiblement éliminés (Asif et al., 2018; Tadkaew et al., 2011). Cependant, selon certaines études, quelques composés typiques ont été efficacement éliminés. Par exemple, malgré la présence de trois atomes de chlore (accepteur d'électrons) et de deux noyaux aromatiques dans sa structure moléculaire, le triclosan a été éliminé à 95 % par un CLEA de laccase *Corioloropsis polyzona* au bout de 150 minutes de traitement dans un réacteur à lit fluidisé opéré en continu (Cabana, Jones et al., 2007). À l'opposé, un fort taux d'élimination a été observé pour les composés portant des fonctions donneuses d'électrons à l'image des groupes hydroxyle (-OH) et amine primaire (R-NH<sub>2</sub>) (Tadkaew et al., 2011; Wijekoon, 2015). La situation s'avère plus complexe lorsqu'il est question de prédire l'élimination de composés possédant simultanément des groupes fonctionnels donneurs et accepteurs d'électrons. Des études spécifiques approfondies, requérant des interprétations biochimiques et l'application des relations quantitatives structure-activité sont alors nécessaires (Tadkaew et al., 2011). Par exemple, le sulfaméthoxazole (de Araujo et al., 2017) et la sulfaméthazine (García-Galán et al., 2011), deux composés avec des groupes sulfonamides (accepteurs d'électrons) et amines (donneurs d'électrons), ont été efficacement éliminés lors de traitements par un champignon de pourriture blanche du bois et par la laccase de *Trametes versicolor*.

Dans la présente étude, cinq enzymes ont été sélectionnées, soit une oxydoréductase (la laccase) et un mélange composé de quatre hydrolases (l'amylase, la lipase, la cellulase et la protéase). Les sous-sections suivantes donnent une brève présentation de chacune de ces enzymes.

## **2.2 Les laccases (EC 1.10.3.2)**

Les laccases (p-diphénol : dioxygène oxydoréductases) sont une famille d'enzymes oxydatives multicuivrées ubiquitaires dans l'environnement. Elles peuvent être isolées sur des plantes, des champignons ou extraites sur des insectes et des bactéries. Les laccases catalysent l'oxydation d'une grande variété de composés phénoliques ou aromatiques en utilisant et en réduisant concomitamment l'oxygène moléculaire (O<sub>2</sub>) comme accepteur d'électrons (Aust et Benson, 1993; Gianfreda, Xu et Bollag, 1999).

La production des laccases est contrôlée par différents gènes. Ces enzymes peuvent ainsi se présenter en plusieurs isoformes (Viswanath, Rajesh, Janardhan, Kumar et Narasimha, 2014). L'existence de ces isoenzymes, en monomères ou dimères (Wong, 2009) dotés de propriétés variables, offre la possibilité de plusieurs types d'interactions avec les substrats. En général, la masse molaire des monomères varie entre 50 kDa et 110 kDa (Wong, 2009). La capacité des enzymes oxydatives telles que les laccases à oxyder des substrats donnés dépend de leur potentiel rédox. Avec un potentiel rédox compris entre +420 et +800 mV, les laccases peuvent oxyder des substrats de type phénolique à faible potentiel rédox (Wong, 2009). Cependant, le couplage de ces enzymes avec des médiateurs appropriés tels que l'acide 2,2' azino-bis-(3-éthyl benzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS) génère des systèmes dits *Laccase-médiateur systems* (LMS) avec des potentiels rédox augmentés. Ces derniers peuvent ainsi oxyder, non seulement des substrats phénoliques, mais également des substrats non phénoliques à plus forts potentiels rédox (Wong, 2009). Cela dit, l'adjonction de médiateurs aux laccases devrait prendre en compte leur coût et leur biodégradabilité.

Globalement, les laccases possèdent quatre atomes de cuivre (Cu) par molécule sur leur site actif, soit un atome de Cu au site de type T1, un atome de Cu au site de type T2 et deux atomes de Cu au site de type T3 (figure 2.1) (Cabana, 2008; Wong, 2009). Ces atomes déterminent la fonctionnalité du site actif. En réalité, le potentiel rédox du cuivre du site T1 détermine en premier la probabilité d'oxydation des substrats (Bourbonnais, Paice, Reid, Lanthier et Yaguchi, 1995). Au repos, tous les atomes de cuivre sont à l'état d'oxydation 2. Initialement, l'oxydation du substrat s'amorce dans le site T1 avec la réduction du cuivre, passant de  $\text{Cu}^{2+}$  à  $\text{Cu}^{+}$  et l'extraction puis le transfert de 4 électrons aux sites T2 et T3. Au niveau du couple T2/T3 dont les trois atomes de cuivre forment un noyau trinucéaire, se passe la réduction de l'oxygène moléculaire en eau par la capture des 4 électrons transférés de T1, et l'enzyme revient à son état de repos (figure 2.1) (Wong, 2009). Globalement, l'action de la laccase consiste en la production de radicaux cationiques capables d'oxyder à leur tour des substrats plus complexes, ce qui peut résulter en leur détoxification (Couto et Toca-Herrera, 2006).

Au cours des dernières décennies, beaucoup d'efforts ont été dédiés aux laccases et plusieurs études ont suggéré le potentiel de ces enzymes à des fins de bioremédiation et d'applications biotechnologiques, entre autres (de Cazes et al., 2014; Gianfreda et al., 1999). En effet, les laccases ont été utilisées pour le désencrage dans l'industrie des pâtes et papiers, pour la dégradation des contaminants phénoliques, des HAP, des pesticides (Nguyen et al., 2014), des chlorophénols (Ahn, Dec, Kim et Bollag, 2002), des perturbateurs endocriniens (Cabana, Jones, et al., 2007; Auriol et al., 2007), des produits pharmaceutiques et de soins personnels (Asif, Hai, Singh, Price et Nghiem, 2017; Cabana, Jiwan, et al., 2007; Lloret et al., 2010; Marco-Urrea, Pérez-Trujillo, Cruz-Morató, Caminal et Vicent, 2010). Le tableau 2.1 présente quelques exemples d'application des laccases pour la décontamination des eaux usées.



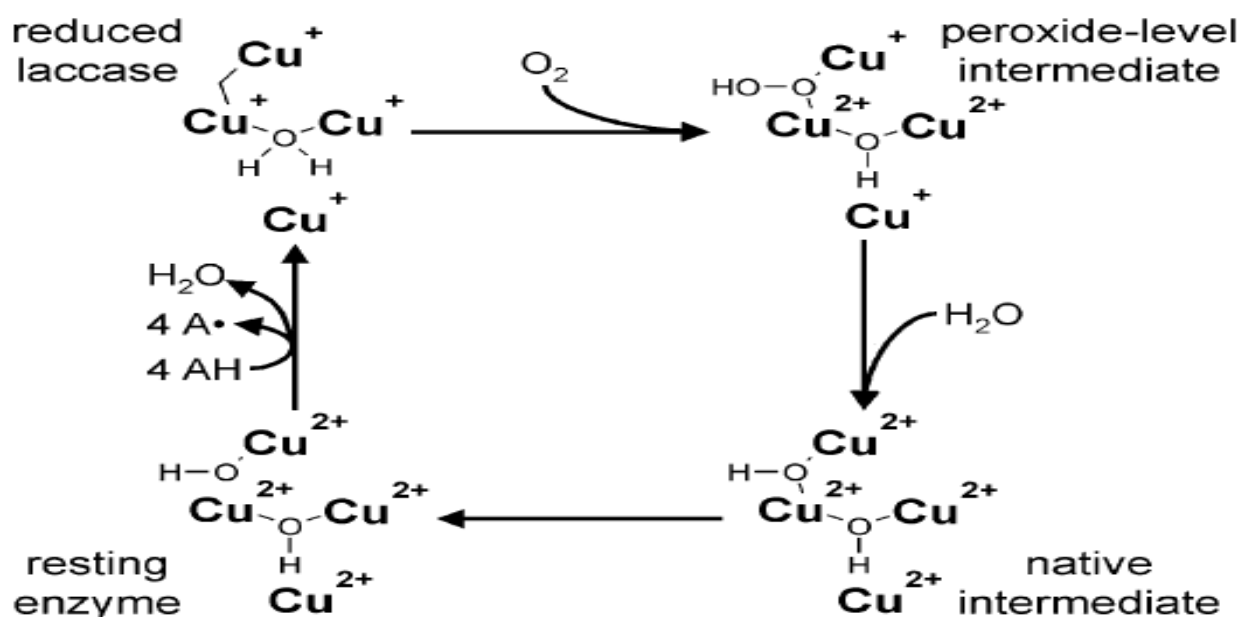


Figure 2. 1 Cycle catalytique de la laccase (tiré de Wesenberg, Kyriakides et Agathos, 2003, p. 165).

Tableau 2. 1 Exemples d'application des laccases à la décontamination des eaux usées

Composés	Traitements	Media	Élimination (%)	Référence
Œstrone, $17\beta$ -estradiol, Œstriol et $17\alpha$ -éthynylestradiol	Laccase libre de <i>Trametes versicolor</i>	Eaux usées synthétiques et naturelles	Approx. 100	Auriol et al. (2007)
Oxybenzone	Laccase libre	Eaux usées	95–100	Garcia, Hoffman, Kinney et Lawler (2011)
DEET Carbamazépine, ibuprofène, atrazine kétoprofène, naproxène, acide salicylique	Laccase libre de <i>Aspergillus oryzae</i> / MD-EMBR	Eaux usées synthétiques	70 60-65 50-55 68	Asif et al. (2018)
Acétaminophène, acide méfénamique, carbamazépine	Agrégats d'enzyme réticulés de laccase/MF	Eaux usées secondaires filtrées	99 100 85	Ba, Jones et Cabana (2014)
<i>p353NP</i> (isomère ramifié du nonylphénol), BPA, TCS	Agrégats d'enzyme réticulés de laccase /fluidized bed reactor (FBR)	Eaux usées synthétiques	90	Cabana, Jones et al. (2007)

## **2.3 Enzymes hydrolytiques**

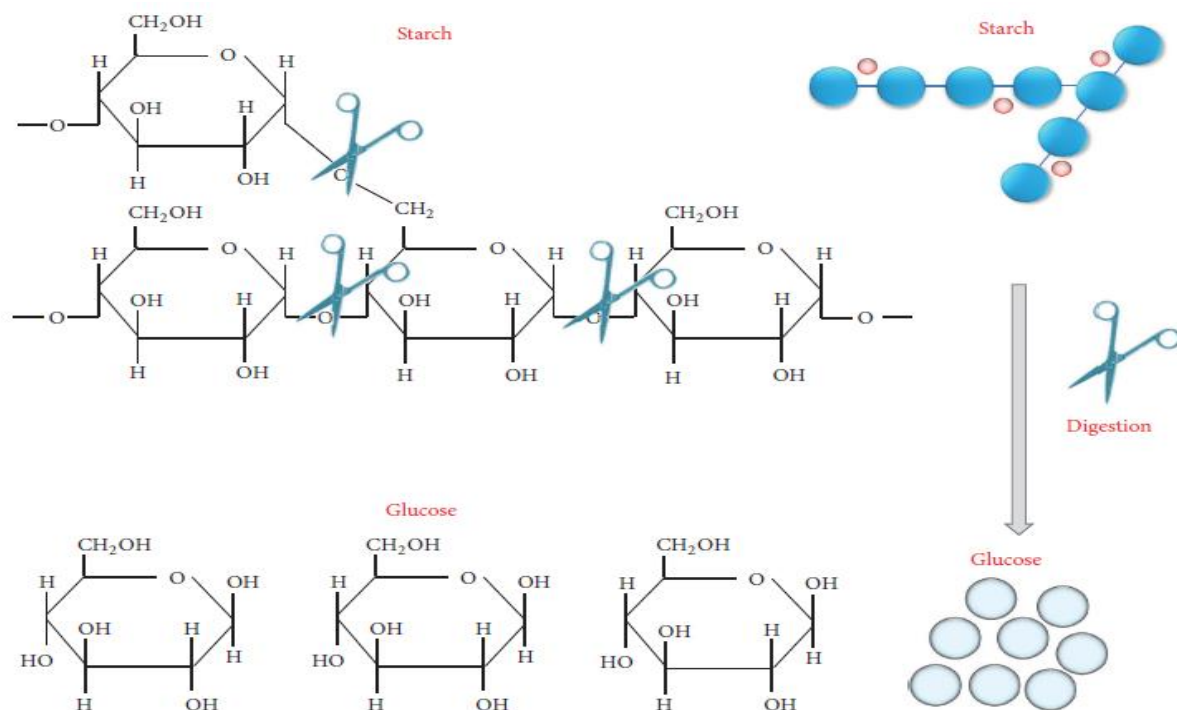
Les enzymes hydrolytiques catalysent l'hydrolyse de certaines liaisons chimiques des protéines, des glucides, des graisses, des esters et d'autres substances macromoléculaires en les transformant en molécules plus simples. Les principaux avantages de ces enzymes résident dans leur omniprésence dans la nature, l'absence de cofacteurs, leur stéréosélectivité et leur tolérance aux solvants miscibles à l'eau (Karigar et Rao, 2011). Les hydrolases peuvent être extraites sur des plantes ou sécrétées par des animaux et des microorganismes. Cette dernière source présente l'avantage de la production de grandes quantités d'enzyme en un laps de temps court, et ce, à des coûts raisonnables (Gopinath et al., 2017). Aussi, ces enzymes extracellulaires exhibent une certaine stabilité sous des conditions sévères de pH, de température de présence d'inhibiteurs etc., tout en offrant une flexibilité remarquable, les rendant aptes à de nombreuses manipulations en ingénierie médicale et biotechnologique (Facchin et al., 2013; Gopinath et al., 2017).

Un certain nombre d'études suggèrent que les hydrolases constituent de sérieux candidats pour la gestion des déchets biodégradables, la désinfection, le traitement des eaux usées (Demarche et al., 2012; Facchin et al., 2013; Karam et Nicell, 1997) et l'enlèvement de composés récalcitrants. En effet, certaines hydrolases exhibent une bonne capacité de rompre des liaisons chimiques majeures dans certains composés organiques tels que les HAP et les insecticides organophosphorés carbamates, entraînant une réduction de leur toxicité (Karigar et Rao, 2011).

Le mélange d'hydrolases utilisé dans cette étude se présente sous forme d'une poudre grossière de quatre enzymes. Les sous-sections suivantes donnent une brève présentation de chacune de ces enzymes et leurs mécanismes catalytiques. En outre, quelques cas d'utilisation de ces enzymes pour le traitement de la contamination due aux polluants organiques sont également exposés.

### **2.3.1 Les amylases (EC 3.2.1.1)**

Les amylases catalysent l'hydrolyse des polysaccharides (ex. : amidon) en maltose et en dextrines, puis en sucres plus simples tels que le glucose (Figure 2.2). En fonction des positions où elles agissent sur les substrats, deux catégories d'amylases se distinguent, soit les exoamylases et les endoamylases. Les exoamylases agissent à partir des extrémités non réductrices des substrats et il en résulte des produits finis courts. Pour leur part, les endoamylases clivent aléatoirement les liaisons intérieures des substrats (amidon, etc.), produisant de nouvelles chaînes plus courtes d'oligosaccharides de différentes longueurs. (Gupta, Gigras, Mohapatra, Goswami et Chauhan, 2003)



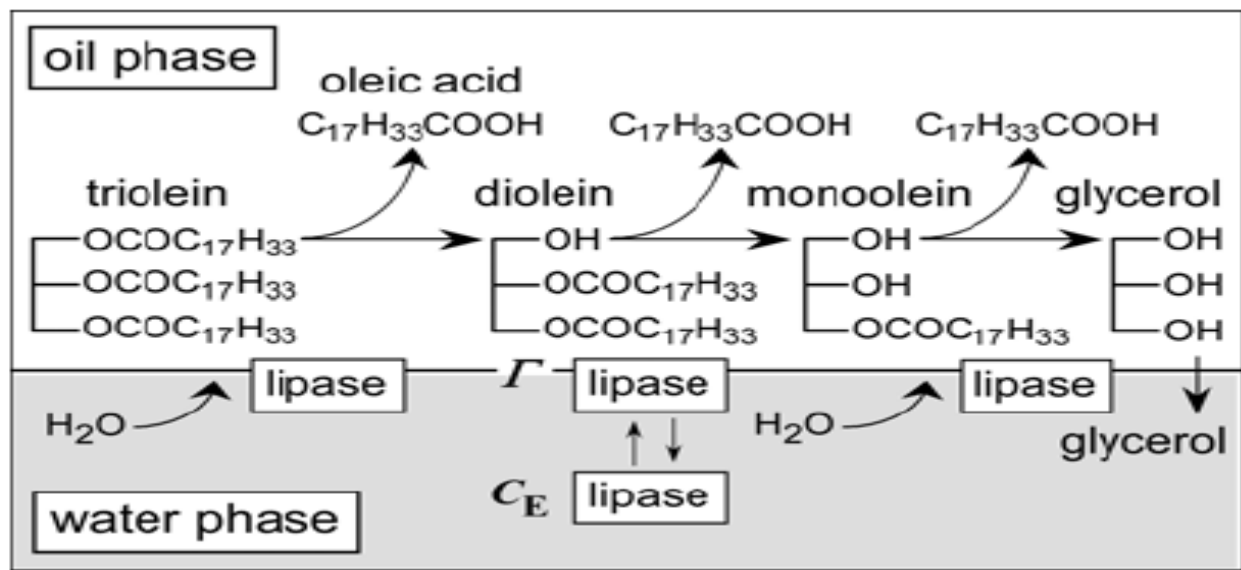
**Figure 2. 2 Schéma simplifié de l'hydrolyse de l'amidon par l'amylase** (tiré de Gopinath et al., 2017, p. 3).

Durant des décennies, les amylases ont été fort exploitées par l'industrie alimentaire, du textile, des pâtes et papiers et des détergents. Elles sont aussi très sollicitées dans la pharmacie, en médecine, de même que dans le traitement des eaux usées (Karam et Nicell, 1997). Certaines études soulignent le potentiel des amylases, en association avec les lipases et les protéases pour la déshydratation des boues et le dégraissage des eaux usées (Karam et Nicell, 1997; Ruggaber et Talley, 2006). Dans une étude à l'échelle de laboratoire, Uwadiae, Yerima et Azike (2011) ont montré que le traitement d'un effluent d'une usine de fabrication de produits pharmaceutiques avec l'amylase, a permis de réduire de 33 % la demande chimique d'oxygène (DCO) après 6 semaines.

### 2.3.2 Les lipases (EC 3.1.1.3)

Les lipases naturelles sont ubiquitaires dans l'environnement. Elles peuvent être isolées sur de nombreuses espèces de plantes, d'animaux et à partir de sources microbiennes, notamment les bactéries, la levure et les champignons (Momsia et Momsia, 2013). Naturellement, les lipases catalysent l'hydrolyse des triglycérides, diglycérides et monoglycérides en acides gras libres et en glycérol (Casas-Godoy et al., 2018). Ces enzymes sont également actives sur de nombreux autres substrats et peuvent catalyser des réactions de synthèse telles que l'estérification ou la transestérification (Kapoor et Gupta, 2012).

Les réactions lipolytiques se déroulent à l'interface d'un système biphasique composé d'une phase organique non miscible contenant le substrat hydrophobique, en présence d'eau (Casas-Godoy et al., 2018). En général, à l'interface de ce système biphasique, les substrats lipidiques sont en équilibre entre les états monomérique, micellaire et émulsifié (Karigar et Rao, 2011). La figure 2.3 montre le mécanisme d'hydrolyse de la trioléine par la lipase de *Candida rugosa* où le système biphasique huile-eau est mis en évidence.



**Figure 2. 3 Mécanisme d'hydrolyse de la trioléine par la lipase *Candida rugosa* dans un système biphasique huile-eau** (tiré de Hermansyah et al., 2007, p. 153).

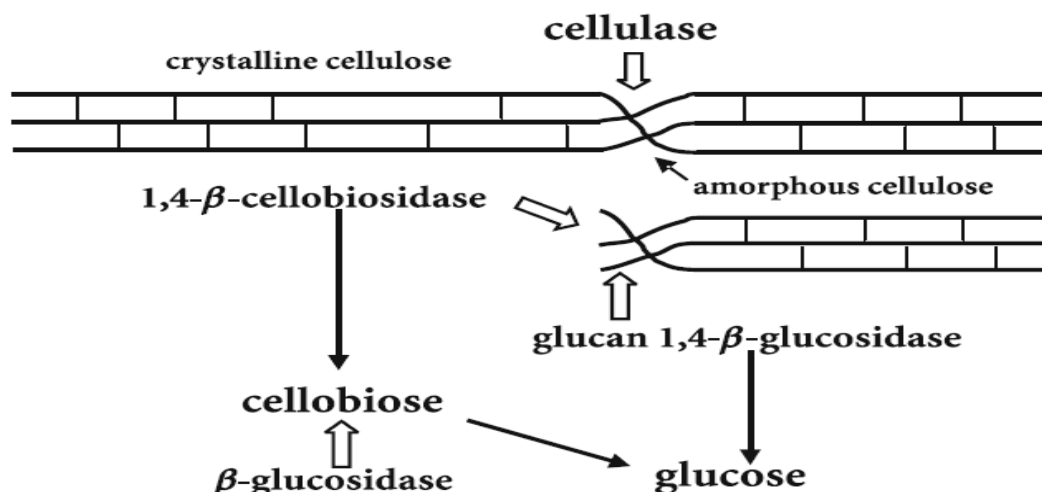
D'après Hasan, Shah et Hameed (2006), les lipases représentent probablement le groupe d'enzymes le plus important pour les applications biotechnologiques. Aussi, en raison de la versatilité de ces enzymes, de nombreuses applications impliquant les lipases continuent d'émerger dans les domaines de la synthèse des polymères et du biodiésel, de la production de médicaments, de produits agrochimiques et des composés odorants (Jaeger et Eggert, 2002). Par ailleurs, les lipases constituent de potentiels candidats pour des applications dans la bioremédiation telles que la décontamination des médias pollués par les rejets ou les fuites d'hydrocarbures (Karam et Nicell, 1997; Karigar et Rao, 2011), la déshydratation des boues (Karam et Nicell, 1997) et la transformation des polyesters (Pandey et al., 1999; Takamoto, Shirasaka, Uyama et Kobayashi, 2001; Tokiwa et Jarerat, 2004). En 2011, Bensoussan et De Gunzburg avaient déposé, en Amérique du Nord (États-Unis et Canada) et dans certains pays européens et africains, un brevet d'invention décrivant des méthodes d'inactivation des antibiotiques dans l'environnement par les lipases. Dans ce brevet, ces inventeurs ont mis en œuvre des compositions associant la laccase, la lipase et/ou la cellulase pour la décontamination d'eaux usées polluées par des antibiotiques. En effet, ces compositions, incluant

parfois des enzymes de désactivation des antibiotiques, ont montré la capacité de désactivation des antibiotiques des systèmes cycliques (ex. : tétracycline, oxytétracycline ou chlorotétracycline) et des systèmes  $\beta$ -lactames (ex. : amoxicilline) (Bensoussan et De Gunzburg, 2012).

### **2.3.3 Les cellulases (EC 3.2.1...)**

Les cellulases forment, avec les amylases, la famille des carbohydrases. Par nature, les cellulases catalysent l'hydrolyse des substrats cellulotiques. À l'instar d'autres enzymes ubiquitaires dans la nature, ces enzymes peuvent être extraites de diverses sources comme les champignons, les bactéries et les protozoaires. Mécaniquement, les cellulases forment une combinaison de trois groupes majeurs de systèmes cellulolytiques dont les actions se complètent en vue de l'hydrolyse totale de la cellulose (figure 2.4) (Ballerini, 2011). Le premier groupe est constitué par les endoglucanases (EG, endo-1,4-D-glucanohydrolase (EC 3.2.1.4)). Celles-ci brisent aléatoirement la structure cristalline interne des liens cellulotiques, créant de nouvelles extrémités de chaînes de polysaccharides. Le deuxième groupe, formant le système des exoglucanases, est composé des 1-4- $\beta$ -glucan-glucanohydrolases (EC 3.2.1.74) ou cellodextrinases et des 1-4- $\beta$ -glucane cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) ou cellobiohydrolases (CBH). Ce système agit sur les extrémités existantes ou celles des chaînes générées par l'action du système endoglucanase et libère le glucose pour les glucanohydrolases et la  $\beta$ -cellobiose pour les cellobiohydrolases comme produits finaux (Ballerini, 2011; Karigar et Rao, 2011; Pérez, Muñoz-Dorado, de la Rubia et Martínez, 2002). Enfin, le troisième système, celui des  $\beta$ -glucosidases ou  $\beta$ -glucohydrolases (EC 3.2.1.21) hydrolyse les cellodextrines solubles et la cellobiose en glucose (Ballerini, 2011; Kuhad, Gupta et Singh, 2011).

Les cellulases sont largement utilisées pour de nombreuses applications diversifiées. En effet, ces enzymes sont abondamment valorisées dans l'industrie alimentaire, des colorants, des textiles et des pâtes et papiers. Elles sont également très courues pour leur utilité dans l'agriculture et dans les procédés de fermentation. La synthèse du biocarburant est sûrement une autre application de taille des cellulases (Karigar et Rao, 2011). La recherche scientifique porte également un intérêt particulier sur les cellulases pour leurs applications biotechnologiques établies ou potentielles (Kuhad et al., 2011).

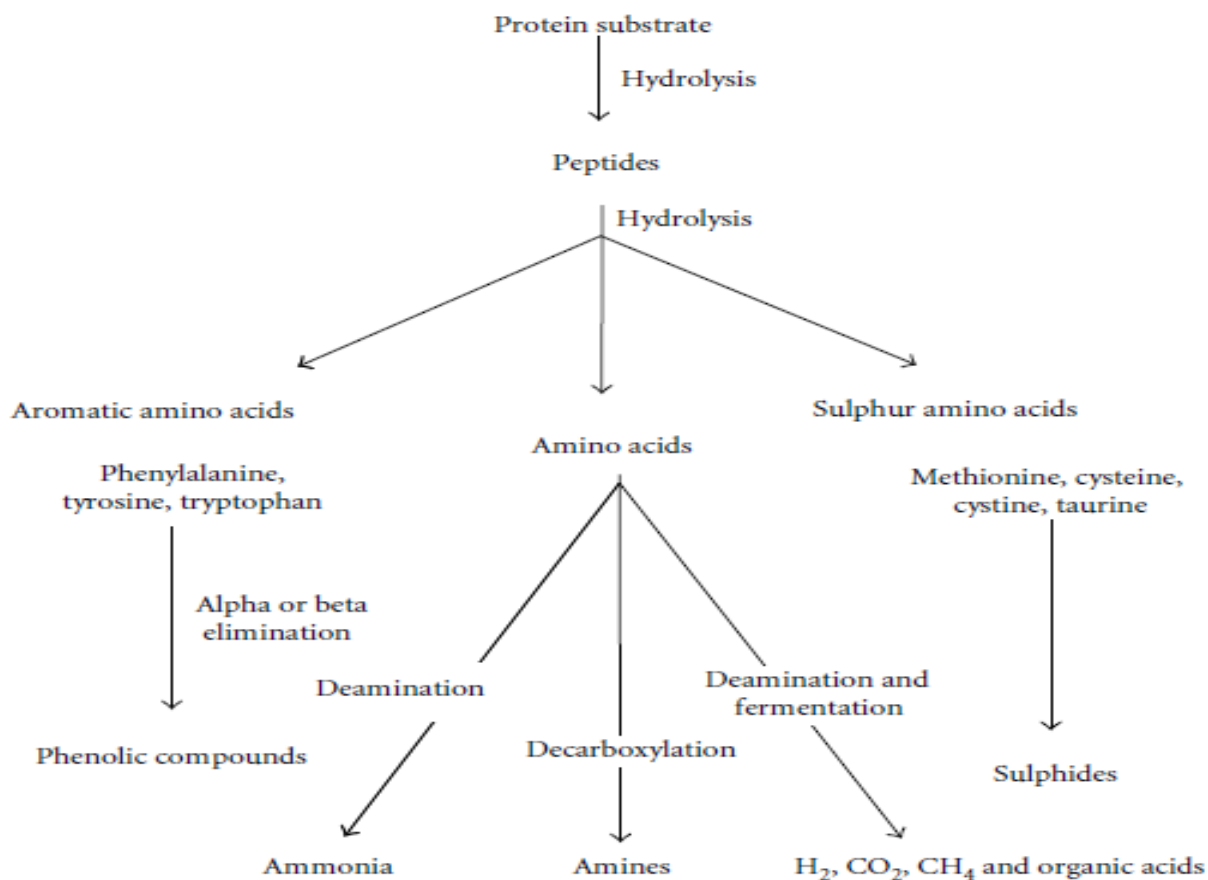


**Figure 2. 4 Mécanisme de l'hydrolyse de la cellulose par les systèmes cellulolytiques fongiques** (tiré de Schmidt et Czeschlik, 2006, p. 95).

### 2.3.4 Les protéases (EC 3.4...)

Dans la nature, les protéases sont produites par les plantes, les animaux ou les micro-organismes. Ces enzymes catalysent l'hydrolyse des liaisons peptidiques des protéines dans un environnement aqueux. En fonction des positions catalysées sur les chaînes de peptides, les protéases sont catégorisées en exopeptidases et endopeptidases (Turk, 2006). Les exopeptidases clivent les groupes amines et carboxyliques en positions terminales des chaînes. Par contre, les endopeptidases agissent sur les liaisons peptidiques en milieu de chaîne (Turk, 2006; Karigar et Rao, 2011). Par ailleurs, selon la position des sites actifs, les endopeptidases peuvent se différencier en endopeptidases à sérine et à aspartate, en peptidases à cystéine et en métallopeptidases, ces dernières nécessitant la présence d'un métal comme cofacteur sur le site actif (Karigar et Rao, 2011). Le mécanisme catalytique des protéases pour les réactions catalysées est proposé dans la figure 2.5.

Les protéases font l'objet d'une large utilisation dans l'industrie alimentaire pour le traitement des déchets d'abattoirs, d'élevage de volailles ou de poissons (Karam et Nicell, 1997). Ces enzymes sont également exploitées par l'industrie pharmaceutique, pour le tannage du cuir et pour le désencrage (Karigar et Rao, 2011). Dans le domaine du traitement des eaux usées, les protéases sont employées pour la défloculation, la déshydratation et la réduction des boues. Par ailleurs, elles ont démontré une excellente capacité de désinfection, dans la mesure où celles-ci ont permis d'atteindre des taux d'élimination de 5 log (99,999 %) et 6 log (99,9999 %) des populations de germes *salmonella* et *coliforme* respectivement, au cours d'un traitement d'eaux usées à l'échelle de laboratoire (Karigar et Rao, 2011).

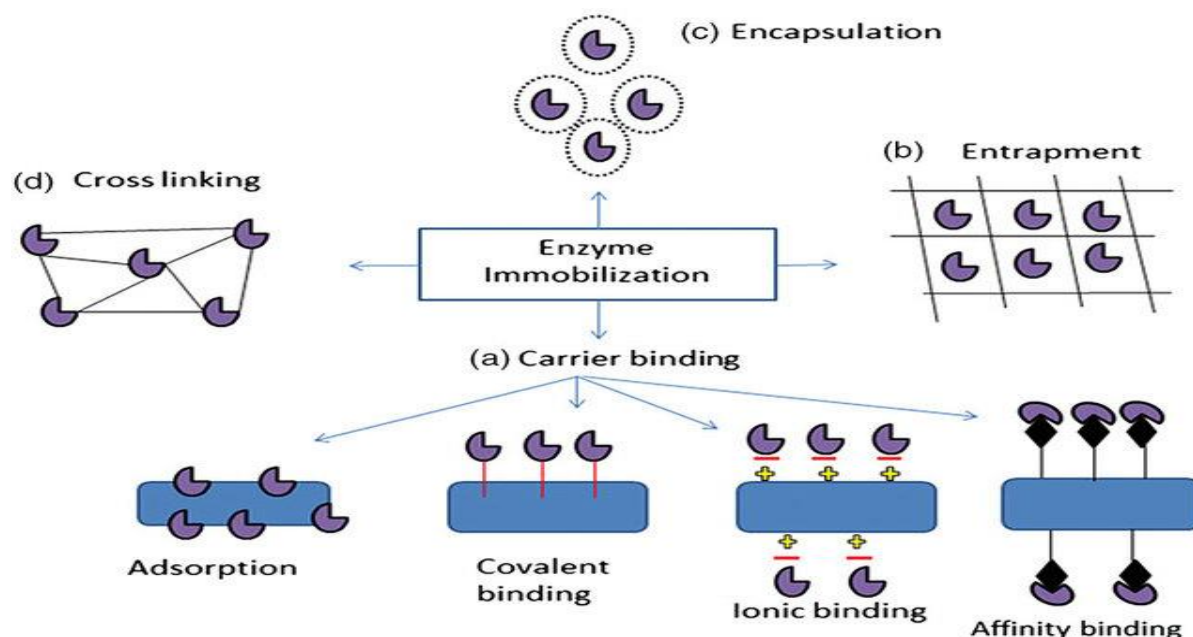


**Figure 2. 5 Principales voies de dégradation des substrats protéiques par protéolyse** (tiré de Karigar et Rao, 2011, p.9, <http://www.open-access-biology.com/probiotics/hughes/fl.gif>).

## 2.4 Immobilisation enzymatique

Certes, les enzymes possèdent plusieurs propriétés qui leur procurent de nombreux avantages comparatifs sur d'autres approches, pour l'enlèvement des contaminants organiques dans les eaux usées par exemple. Cependant, la plupart des études relatives à cet usage spécifique des enzymes ont été réalisées à l'échelle de laboratoire ou, au plus, dans des essais pilotes, en conditions idéalisées avec de nombreuses simplifications. Le passage à l'échelle industrielle de l'approche enzymatique est encore confronté à quelques obstacles. L'optimisation des conditions spécifiques de production d'enzymes de différentes souches (Couto et Toca-Herrera, 2006), les coûts de production des enzymes, leur stabilité vis-à-vis des conditions de stockage ou d'utilisation et de la présence d'inhibiteurs, etc. sont autant de contraintes qui freinent l'éclosion de cette technologie (Sheldon, 2007a, 2007b, 2011). Contourner ces obstacles passe par la production de catalyseurs robustes, c'est-à-dire dotés de propriétés intrinsèques améliorées. L'immobilisation enzymatique est l'une des stratégies appliquées pour y parvenir. En effet, l'immobilisation confère aux enzymes des caractéristiques bonifiées les rendant plus stables face aux températures élevées, au pH, aux solvants

organiques, aux inhibiteurs et aux changements de conditions des milieux (Cao, Langen et Sheldon, 2003; Hanefeld, 2013; Sheldon, 2007a, 2007b, 2011). En conséquence, les catalyseurs produits par immobilisation peuvent globalement présenter une meilleure stabilité et une meilleure rentabilité par rapport à leurs homologues sous formes libres (Guauque Torres et al., 2013; Hanefeld, 2013; Sheldon, 2007a, 2007b, 2011). Fondamentalement, trois stratégies d'immobilisation sont fréquemment utilisées, soit l'immobilisation sur supports insolubles, l'encapsulation et l'immobilisation sans supports (Sheldon, 2007a, 2007b, 2011).



**Figure 2. 6 Différentes stratégies d'immobilisation enzymatique** (tiré de Sankaran, Show et Chang, 2016, p. 903).

#### 2.4.1 L'immobilisation sur supports

L'immobilisation sur supports (Figure 2.6 (a)) est une stratégie où les enzymes sont attachées sur ou à l'intérieur d'un matériau insoluble, bâtissant ainsi un système de catalyseur hétérogène. Le support peut être de différentes natures comme des résines synthétiques, des biopolymères (ex. : amidon) ou des polymères inorganiques à l'image de la silice ou de la zéolite. La fixation des enzymes aux supports s'opère par différentes liaisons non covalentes telles que l'adsorption physique non spécifique (ex. : interactions hydrophiles, ponts hydrogène et forces de van der Waals), les interactions électrostatiques, les interactions hydrophobiques ou l'adsorption par affinité (Sankaran et al., 2016).

Des interactions de nature ionique ou covalente peuvent également intervenir. Parmi toutes ces interactions, les liaisons covalentes se montrent les plus fortes et procurent une meilleure stabilité aux catalyseurs ainsi produits (Hanefeld, 2013; Sheldon, 2007a, 2007b, 2011).



L'immobilisation sur supports comporte quelques inconvénients. En effet, les enzymes ou les substrats peuvent bloquer les pores des supports et provoquer ainsi un encombrement stérique. Aussi, en dehors des liens covalents, les interactions forgeant les liaisons enzymes-supports sont de nature faible. Il peut facilement en résulter la déstabilisation de ces liaisons et la lixiviation ou le détachement de l'enzyme lors de l'utilisation du système dans un procédé en continu en milieu aqueux ou lorsque le catalyseur formé est soumis à des contraintes mécaniques. De plus, lorsque, suite à plusieurs utilisations répétées, la désactivation de l'enzyme immobilisée survient, elle implique la perte définitive des supports pourtant onéreux. Enfin, l'immobilisation sur supports offre de faibles productivités, étant donné que les substrats, constitués de matériaux non catalytiques, peuvent représenter jusqu'à 95 % de la masse du catalyseur immobilisé (Jia, Yazdani, Zhang, Cui et Chen, 2018; Sheldon, 2007a).

#### **2.4.2 L'encapsulation**

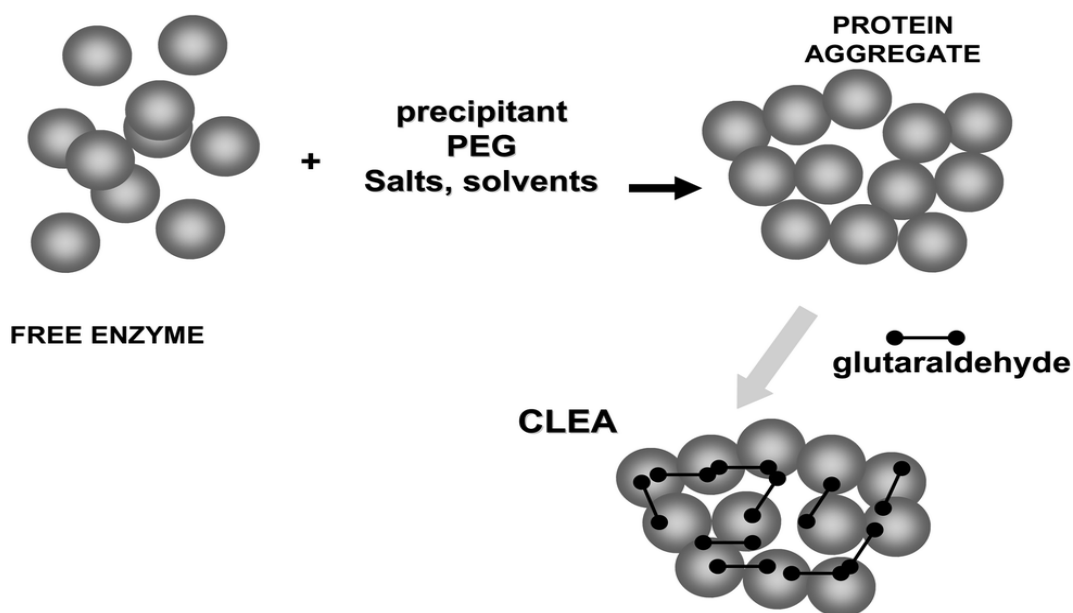
L'encapsulation est une stratégie d'immobilisation qui consiste en une inclusion (ou un piégeage) de l'enzyme dans des réseaux de polymères ou dans des matériaux de type membranaire (figure 2.6 (b)). Il est nécessaire que la synthèse des réseaux de polymères se mette en place en présence de l'enzyme. Les matériaux tels que les polymères organiques (ex. : amidon), la silice sol-gel ou les membranes à fibres creuses sont fréquemment utilisés pour la synthèse des réseaux de polymères (Sheldon, 2007a). Une autre forme de catalyseur peut être construite par encapsulation (figure 2.6 (c)) par piégeage de l'enzyme dans un matériau tel que les microcapsules. En plus de la possibilité de la perte d'enzyme par lixiviation ou par détachement, le fort ratio de masse de matériau non catalytique à la masse d'enzyme constitue un inconvénient majeur lié à la technique d'encapsulation (Jia et al., 2018; Sheldon, 2007a).

#### **2.4.3 La formation d'agrégats d'enzymes réticulés**

Fondamentalement, les agrégats d'enzymes réticulés (*Cross-linked enzyme aggregates* [CLEA]) sont formés par immobilisation par liaisons covalentes d'agrégats physiques de molécules d'enzymes obtenus par précipitation entre eux (Lopez-Serrano, Cao, van Rantwijk et Sheldon, 2002; Sheldon, 2007a). En général, le processus de formation des CLEA comprend deux principales phases. En premier lieu, les enzymes sont précipitées par l'ajout de solvants organiques (ex. : acétone, méthanol, tert-butanol, isopropanol, etc.), de polymères non ioniques (ex. : polyéthylène glycol) ou de sels (ex. : sulfate d'ammonium). Ensuite, à l'aide d'un agent de réticulation bifonctionnel ou multifonctionnel, des liens de covalence sont établis entre les agrégats d'enzymes (Figure 2.7). Habituellement, le glutaraldéhyde (GLA), un réactif bifonctionnel, est utilisé comme agent de réticulation en raison de son coût abordable, de sa disponibilité sur le marché (Sheldon, 2007a) et de sa réactivité (Migneault, Dartiguenave, Bertrand et Waldron, 2004). La réticulation des agrégats d'enzymes intervient lorsque les molécules de GLA sous

formes d'oligomères ou de polymères forment des liaisons covalentes avec les groupes libres d'amines (-NH<sub>2</sub>), de thiols (-SH) ou d'hydroxyles (-OH) avec les résidus de lysine présents à la surface des molécules d'enzymes voisines (Migneault et al., 2004; Sheldon, 2007a).

De nombreux facteurs gouvernent la formation des CLEA parmi lesquels, la concentration en protéines des enzymes, le choix et la concentration des agents précipitants et des agents de réticulation. De plus, les conditions opératoires telles que le pH et le temps de précipitation et de réticulation, de même que l'agitation mécanique influencent fortement la formation et la robustesse des CLEA (Sheldon, 2007a; Velasco-Lozano, López-Gallego, Mateos-Díaz et Favela-Torres, 2016).



**Figure 2. 7 Préparation d'agrégats d'enzymes réticulés (CLEA)** (tiré de Barbosa et al., 2014, p. 1586).

Les CLEA possèdent plusieurs avantages, en particulier par rapport aux catalyseurs immobilisés sur supports. Les CLEA exhibent en général des activités inférieures à celles des enzymes libres correspondantes. Cependant, ils forment des systèmes plus robustes comparativement aux enzymes libres. En effet, les CLEA démontrent généralement une meilleure stabilité vis-à-vis du pH, de la température et des substances inhibitrices des enzymes (ex. : solvants organiques). Ces caractéristiques leur confèrent la capacité de réutilisation en procédés continus. Les CLEA offrent également une meilleure rentabilité volumétrique, puisque ces catalyseurs ne requièrent pas de supports. De plus, selon l'usage projeté, il n'est pas important de passer par l'étape exigeante de purification des enzymes. En somme, l'absence de supports en général onéreux, de purification enzymatique, en plus de la simplicité du processus de leur préparation, les CLEA s'avèrent économiquement plus avantageux (Sheldon, 2007a, 2007b).

### **3 UTILISATION DE LA LACCASE, D'UN MELANGE D'HYDROLASES ET D'UNE COMBI-CLEA DE CES ENZYMES POUR L'ENLÈVEMENT DE CONTAMINANTS ORGANIQUES EN TRACES DANS UNE EAU USÉE SYNTHÉTIQUE**

Les problématiques environnementales actuelles imposent la recherche de solutions novatrices pour répondre à celles-ci. Parmi les grands défis présents, figure la présence dans l'environnement de contaminants organiques à l'état de traces auxquels sont associés des effets nocifs potentiels pour les organismes aquatiques et les humains. De plus, en raison du contexte global actuel de crise énergétique, les nouvelles technologies de décontamination proposées doivent démontrer leur efficacité énergétique et leur innocuité pour l'environnement, en plus d'être économiquement viables. Les traitements biologiques, physiques et chimiques appliqués pour l'enlèvement des contaminants organiques dans les eaux usées ont démontré une certaine efficacité. Cependant, ils recèlent quelques insuffisances et inconvénients de taille, en l'occurrence la faible élimination de certains composés récalcitrants, les coûts d'implantation et d'opération élevés de certaines installations et/ou l'émission de sous-produits toxiques. Par conséquent, ces inconvénients pourraient finalement compromettre les bénéfices attendus de ces traitements.

Depuis quelques décennies, certaines études démontrent que les enzymes possèdent des caractéristiques intéressantes pour la décontamination de l'environnement (voir chapitre 2). Les traitements par catalyse enzymatique portent ainsi l'espoir d'une alternative offrant la possibilité d'éviter les inconvénients liés à certains traitements traditionnels. Ils peuvent également les compléter.

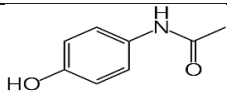
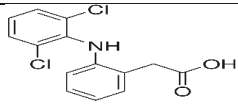
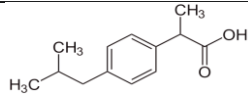
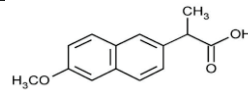
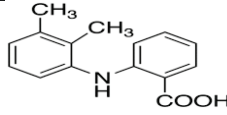
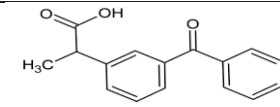
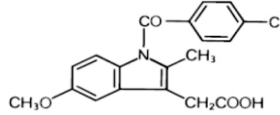
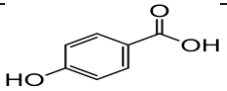
Dans ce chapitre, le potentiel de la laccase (EC 1.10.3.2) fongique de *Trametes hirsuta*, d'un mélange d'hydrolases constitué d'amylase (EC 3.2.1.1), de lipase (EC 3.1.1.3), de cellulase (EC 3.2.1...) et de protéase (EC 3.4...) ainsi que d'une combi-CLEA pour l'enlèvement des TrOC dans une eau usée synthétique a été étudié. En premier lieu, des tests de dégradation des TrOC ont été réalisés avec des préparations des enzymes sous formes libres. Puis, une combi-CLEA produite *via* la formation d'agrégats d'enzymes réticulés à partir de ces 5 enzymes a été synthétisée. Ce nouveau catalyseur a été caractérisé en déterminant ses paramètres cinétiques ( $V_{max}$ ,  $K_m$ , etc.) et son rendement d'immobilisation. Par la suite, des tests d'élimination des TrOC par ce catalyseur ont été réalisés avec des échantillons de la même eau usée synthétique. En outre, la stabilité de la combi-CLEA a été déterminée après son exposition au mélange réactionnel pendant 24 h. Finalement, l'impact des paramètres d'opération tels que le pH, la température et le temps de contact sur l'élimination des TrOC par les différents catalyseurs a été déterminé.

### 3.1 Contaminants ciblés

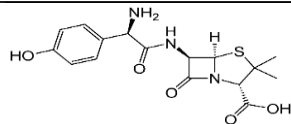
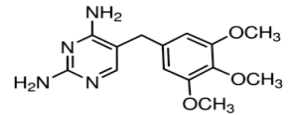
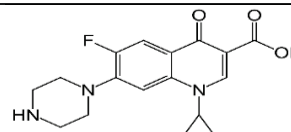
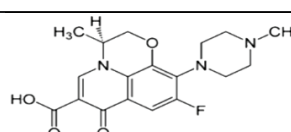
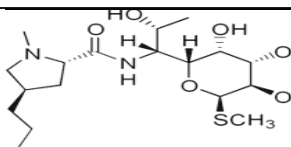
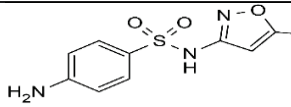
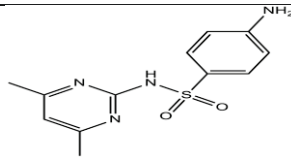
Sur 35 composés (à  $10^4$  µg/l chacun) présents dans une solution mère combinée, 22 ont été analysés. Les différentes catégories de TrOC représentées sont les produits pharmaceutiques (*Pharmaceutical active compounds* [PhACs]), les produits de soins personnels (PSP) et les pesticides. Parmi les PhACs analysés, figurent un anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS), des antibiotiques, des anticonvulsivants, des antihypertenseurs, des régulateurs de lipide, des bêta-bloquants, des stimulants et une hormone thyroïdienne. En ce qui concerne les pesticides, deux sous-catégories, à savoir des insecticides et des herbicides ont été sélectionnés. Enfin, un ingrédient de crème solaire et un agent antigivre font partie des molécules contenues dans la solution mère combinée. Les molécules analysées sont celles compatibles avec la méthode d'extraction et d'analyse UPLC/MS/MS utilisée dans cette étude. Cette méthode est expliquée dans la section 3.2 ci-après (section expérimentale).

Le tableau 3.1 présente quelques propriétés physico-chimiques des 35 composés d'intérêt. Ces derniers ont été choisis sur la base des facteurs tels que les volumes consommés, l'occurrence dans les effluents (traités et non traités) et dans les cours d'eau en Amérique du Nord, ainsi que leur potentiel à produire des effets négatifs sur les organismes aquatiques et les humains. De plus, ces molécules représentent des indicateurs pertinents des principales classes de contaminants organiques potentiellement présents dans l'environnement. Enfin, les méthodes analytiques existantes offrent une bonne précision pour la quantification de ces composés en concentrations environnementales. (Bradley et al., 2017; Kolpin et al., 2002; Petrie et al., 2008)

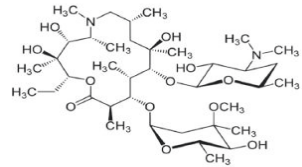
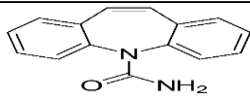
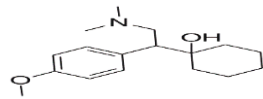
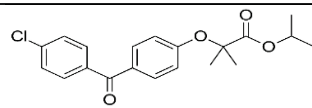
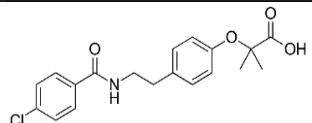
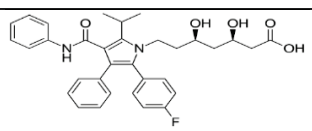
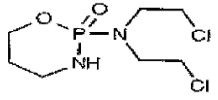
**Tableau 3. 1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés (suite)** (compilation d'après : PubChem, 2019; Kim, Lee, Lee et Kwon, 2009, p. 187; Wang et al., 2018, p. 4).

Classes	Composés	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure Moléculaire	Masse moléculaire	Log Kow
Antiinflammatoire non stéroïdien (AINS)	Acétaminophène	103-90-2	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>		151,17	0,30-0,46
	Diclofénac	15307-79-6	C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>		296,15	1,77
	Ibuprofène	15687-27-1	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>		206,28	0,94
	Naproxène	22204-53-1	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>		230,30	0,73
	Acide méfénamique	61-68-7	C <sub>15</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub>		241,29	5,12
	Kétoprofène	22071-15-4	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>		254,30	0,19
	Indométhacine	53-86-1	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>4</sub>		357,79	0,91
	Acide salicylique	69-72-7	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>		138,12	-1,13

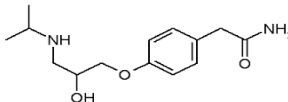
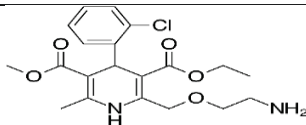
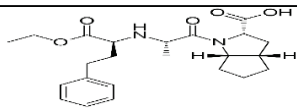
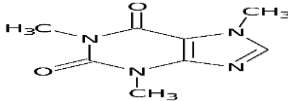
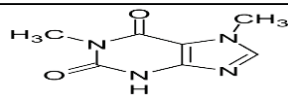
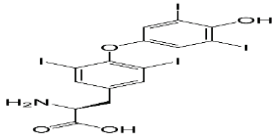
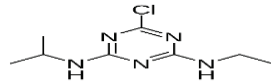
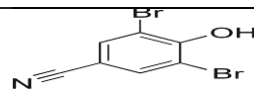
**Tableau 3. 1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés (suite)** (compilation d'après : PubChem, 2019; Kim, Lee, Lee et Kwon, 2009, p. 187; Wang et al., 2018, p. 4).

Classes	Composés	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure Moléculaire	Masse moléculaire	Log Kow
Antibiotique	Amoxicilline	26787-78-0	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S		365,40	0,91
	Triméthoprim	738-70-5	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>		290,32	0,87
	Ciprofloxacine	85721-33-1	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>		331,34	0,28
	Ofloxacine	82419-36-1	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		361,37	-0,39
	Lincomycine	154-21-2	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S		406,54	0,20
	Sulfaméthoxazole	723-46-6	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S		253,28	0,48
	Sulfaméthazine	57-68-1	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S		278,33	0,14

**Tableau 3. 1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés (suite)** (compilation d'après : PubChem, 2019; Kim, Lee, Lee et Kwon, 2009, p. 187; Wang et al., 2018, p. 4).

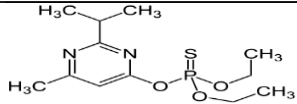
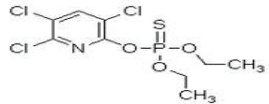
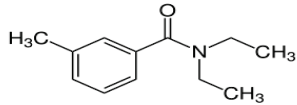
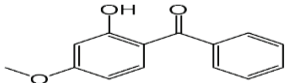
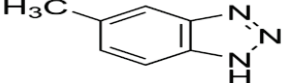
Classes	Composés	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure Moléculaire	Masse moléculaire	Log Kow
	Azithromycine	117772-70-0	C <sub>38</sub> H <sub>72</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub>		748,98	4,02
	Carbamazépine	298-46-4	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O		236,27	2,25-2,45
Antidépresseur /anticonvulsivant	Venlafaxine	93413-69-5	C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> NO <sub>2</sub>		277,40	3,20
	Fénofibrate	49562-28-9	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> ClO <sub>4</sub>		360,83	5,19
	Bézafibrate	41859-67-0	C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>4</sub>		361,82	3,99
Fibrate	Atorvastatin	134523-00-5	C <sub>33</sub> H <sub>35</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		558,64	5,7
Antinéoplasique	Cyclophosphamide	6055-19-2	C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> P		261,08	0,63

**Tableau 3. 1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés (suite)** (compilation d'après : PubChem, 2019; Kim, Lee, Lee et Kwon, 2009, p. 187; Wang et al., 2018, p. 4).

Classes	Composés	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure Moléculaire	Masse moléculaire	Log Kow
Antihypertenseurs	Aténolol	29122-68-7	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		266,34	0,16
	Amlodipine	88150-42-9	C <sub>20</sub> H <sub>25</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		408,88	3,00
	Ramipril	87333-19-5	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		416,51	2,90
Stimulant	Caféine	58-08-2	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		194,19	-0,07
	Paraxanthine	611-59-6	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>		180,16	0,24
Hormone thyroïdienne	Lévothyroxine	51-48-9	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> I <sub>4</sub> NO <sub>4</sub>		776,87	4,00
Herbicide	Atrazine	1912-24-9	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>		215,68	2,64
	Bromoxynil	1689-84-5	C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> NO		276,91	2,70



**Tableau 3. 1 Quelques propriétés physico-chimiques des composés chimiques étudiés (suite)** (compilation d'après : PubChem, 2019; Kim, Lee, Lee et Kwon, 2009, p. 187; Wang et al., 2018, p. 4).

Classes	Composés	Numéro CAS	Formule moléculaire	Structure Moléculaire	Masse moléculaire	Log Kow
Insecticide	Diazinon	333-41-5	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS		304,35	3,81
	Chlorpyrifos	2921-88-2	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS		350,59	4,96
Répulsif	DEET	134-62-3	C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO		191,27	2,42
Filtre UV	Oxybenzone	131-57-7	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>		228,24	3,89
Agent antigivre	5-méthyl-1H-benzotriazole	136-85-6	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub>		133,15	1,23

## **3.2 Section expérimentale**

### **3.2.1 Réactifs chimiques**

Tous les produits chimiques et réactifs étaient de qualité analytique ou de la plus haute pureté disponible. Le mélange d'hydrolases en poudre a été fourni par Nuvac Écoscience Inc. (Racine, Qc, Canada). Sauf autrement indiqué, les échantillons de composés chimiques et les autres produits ont été approvisionnés chez Sigma-Aldrich Corporation (Saint-Louis, MO, USA). La laccase de souche fongique *Trametes hirsuta* a été obtenue chez *Microbial Type Culture Collection Centre*, (Inde). Tous les solvants utilisés étaient de qualité conforme aux normes HPLC.

### **3.2.2 Préparation des solutions d'enzymes libres**

Les préparations du mélange d'hydrolases ont été réalisées par délayage de la poudre d'enzymes dans une solution tampon de phosphate de potassium ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 100 mM, pH 7). Ces préparations ont été manuellement remuées pendant 10 minutes. Elles ont ensuite été centrifugées à 3 260 x g pendant 10 minutes et les surnageants recueillis ont servi de solutions d'enzymes brutes.

Pour la préparation de laccase, cinq morceaux circulaires de 0,80 cm<sup>2</sup> de mycélium ont été introduits dans 200 ml de milieu de culture préalablement stérilisé à l'autoclave. La composition du milieu de culture était la suivante: 10 g/l d'extrait de malt, 4 g/l de dextrose, 4 g/l d'extrait de levure, 2 g/l de  $NH_4NO_3$ , 0,8 g/l de  $KH_2PO_4$ , 0,4 g/l de  $Na_2HPO_4$ , 0,5 g/l de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . L'inoculum a été cultivé à 22 °C dans un flacon Erlenmeyer de 500 ml en pyrex sur un agitateur orbital tournant à 150 tpm. Après de 7 jours d'incubation, la solution a été centrifugée à 3 260 x g pendant 10 minutes et les résidus solides écartés. Le surnageant recueilli (dont le pH mesuré était 6,52) a servi de solution brute de laccase. Toutes les préparations d'enzyme non utilisées ont été conservées à 4 °C pendant un temps limité.

### **3.2.3 Activités enzymatiques**

L'activité des différentes enzymes a été déterminée suivant des protocoles expérimentaux spécifiques, avec un spectrophotomètre UV-Vis à double faisceau (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA). Outre l'activité enzymatique, la concentration en protéines des différentes préparations a été quantifiée selon la méthode BCA utilisant une solution de sérum-albumine bovine (BSA) comme standard.

L'activité de l'amylase a été déterminée par l'analyse colorimétrique du maltose à 546 nm lors de l'hydrolyse de l'amidon en solution concentrée à 1 % (m/v) dans une solution tampon de citrate de sodium (50 mM, pH 4,8). Dans les conditions de l'essai, une unité (U) d'activité a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour la production de 1  $\mu$ mole de maltose par minute.

L'activité de la lipase a été mesurée par l'analyse colorimétrique à 410 nm du para-nitrophénol ( $\epsilon_{\max} = 17\,500\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) produit lors de l'hydrolyse du para-nitrophényl palmitate (pNPP) comme substrat dans une solution de 0,53 mM. Le pH du mélange réactionnel a été ajusté à 8 par une solution tampon de phosphate de sodium (200 mM; pH 8). Une unité (U) d'activité a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire à la formation de 1  $\mu$ mole de para-nitrophénol par minute, dans les conditions de l'essai.

L'activité de la cellulase a été déterminée par mesure colorimétrique des sucres réducteurs formés lors de l'hydrolyse du substrat cellulosique (Papier filtre Whatman n° 1). Le pH du mélange réactionnel a été ajusté à 4,8 par une solution tampon de citrate de sodium (50 mM; pH 4,8). Dans les conditions de l'essai, une unité de papier filtre (FPU) a été déterminée comme la quantité d'enzyme nécessaire pour la production de couleur équivalente à 1  $\mu$ mole de sucres réducteurs par minute à 540 nm.

L'activité de la protéase a été déterminée par dosage de la tyrosine produite lors de l'hydrolyse de la caséine (Cupp-Enyard, 2008). Le pH du mélange réactionnel a été ajusté par une solution tampon de phosphate de potassium (50 mM, pH 7,5). Dans les conditions de l'essai, une unité (U) d'activité est définie comme la quantité d'enzyme pouvant hydrolyser la caséine nécessaire pour la production de couleur (mesurée à 660 nm) équivalente à 1  $\mu$ mole de tyrosine par minute.

L'activité de la laccase a été quantifiée en mesurant l'oxydation de l'acide 2,2'-azino-bis-(3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) en son radical cationique ( $\text{ABTS}^{+\cdot}$ ) à 420 nm ( $\epsilon_{\max} = 3,6 \times 10^4\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Le mélange réactionnel contenait 1 mM d'ABTS et son pH a été ajusté à 4 par une solution tampon de 0,02 M d'acétate de sodium. Dans les conditions de l'essai, une unité (U) d'activité est exprimée comme la quantité d'enzyme ayant formé 1  $\mu$ mole d' $\text{ABTS}^{+\cdot}$  par minute.

Pour chaque enzyme de la combi-CLEA, le rendement d'immobilisation par rapport à l'activité massique des catalyseurs a été exprimé en pourcent (%) et calculé selon les équations E1 à E3 :

$$Y = A_{\text{cat}} / A_{\text{tt}} \quad \text{E1}$$

Y = rendement d'immobilisation (%)

$A_{\text{cat}}$  = Activité du catalyseur formé (U)

$A_{tt}$  = Activité théorique transférée au catalyseur

$$A_{cat} = A(U/mg) \times m_{cat} \quad E2$$

$A(U/mg)$  = Activité par masse de catalyseur formé

$m_{cat}$  = masse du catalyseur (mg)

$$A_{tt} = A_i \times V_i - A_f \times V_f - \sum_{j=1}^n A_{L_j} \times V_{L_j} \quad E3$$

$A_i$  = Activité initiale de l'enzyme libre (U/ml)

$V_i$  = Volume de l'enzyme libre initial (ml)

$A_f$  = Activité du catalyseur formé (U/ml)

$V_f$  = Volume final de récupération du catalyseur (ml)

$A_{L_j}$  = Activité dans le volume du  $j^{ième}$  lavage (U/ml)

$V_{L_j}$  = Volume du  $j^{ième}$  lavage (ml)

$n$  = nombre de lavages dans lesquels une activité de l'enzyme considérée est détectée

### 3.2.4 Préparation de la combi-CLEA

À partir de 40 ml d'une solution 1:1 (v/v) de laccase (890 U/l) et du mélange d'hydrolases (amylase : 2987 U/l, lipase : 52 U/l, cellulase : 92 FPU/l et protéase : 440 U/l), la combi-CLEA a été préparée selon un protocole adapté de Lopez-Serrano, Cao, van Rantwijk et Sheldon (2002).

Dans un premier temps, les enzymes ont été précipitées par l'ajout progressif à 60 % (m/v) de sulfate d'ammonium  $(NH_4)_2SO_4$  avec agitation manuelle modérée jusqu'à dissolution complète. Ensuite, la solution obtenue a été conservée à la température du laboratoire (22 °C), sans agitation pendant une heure. En second lieu, les agrégats d'enzymes formés ont été réticulés avec une solution de glutaraldéhyde (GLA) 25 % (v/v), ajoutée goutte à goutte jusqu'à une concentration finale de 40 mM avec agitation manuelle modérée du contenant pendant 10 minutes. Ce nouveau mélange a été conservé à 4 °C dans l'obscurité et sans agitation, pendant 24 heures. Subséquemment, la solution a été centrifugée à 3260 x g pendant 10 minutes puis le culot lavé successivement, une première fois avec 9 ml de solution tampon de phosphate potassium pH 7, et trois fois avec 6 ml d'eau ultrapure. Aucune activité de la laccase et des hydrolases n'a été détectée dans le surnageant après le quatrième lavage. Les différents surnageants ont été récupérés et le pellet final a été dissout dans 6 ml de solution de phosphate de potassium pH 7. Tous les surnageants et la préparation finale de combi-CLEA ont été conservés à 4 °C.

### 3.2.5 Paramètres cinétiques des catalyseurs

Les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) de la laccase, des hydrolases et du combi-CLEA ont été déterminés à 22 °C, dans une solution tampon de phosphate de potassium ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ , 100 mM, pH 7). Au premier abord,  $V_{max}$  et  $K_m$  ont été déterminés en mesurant l'activité des différents catalyseurs, avec leurs substrats spécifiques et selon les gammes de concentrations présentées dans le tableau 3.2. Ensuite, ces mêmes paramètres ont été déterminés lors de tests d'élimination des TrOC comme substrats. Pour ce faire, l'acétaminophène a été choisi comme substrat modèle. D'abord, une solution contenant uniquement l'acétaminophène a été traitée avec les préparations de laccase, du mélange d'hydrolases et de la combi-CLEA. Comme pour les substrats spécifiques des enzymes, différentes concentrations d'acétaminophène ont été testées (tableau 3.2). Puis, un deuxième groupe de tests a été conduit avec ces mêmes catalyseurs, cette fois, avec une solution contenant 35 composés. Les valeurs de  $V_{max}$  et  $K_m$  sont déterminées à partir de l'équation de Michaelis-Menten (E4) :

$$V = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad E4$$

V : vitesse de transformation du substrat par l'enzyme

$V_{max}$  : vitesse transformation maximale du substrat

[S] : concentration en substrat

$K_m$  : coefficient de demi-vitesse de Michaelis-Menten

Dans cette étude, ces valeurs ont été déterminées à partir de courbes d'ajustement (curve fitting) de la vitesse de réaction (V) en fonction des concentrations de substrat [S] en utilisant le logiciel SigmaPlot 14 (San Jose, CA, USA).

**Tableau 3. 2 Gammes de concentrations des substrats pour la détermination des paramètres de Michaelis- Menten**

Enzymes	Substrats	Gammes de concentrations	Unités
Laccase	ATBS	0,0; 0,2; 0,4; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 2,0	mM
Amylase	Amidon	0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; 20,0	mg/ml
Lipase	pNPP	0,0; 0,13; 0,27; 0,40; 0,53; 0,66; 0,80; 0,93; 1,06	mM
Cellulase	Papier filtre	0,0; 6,67; 16,7; 33,3; 50,0; 66,7; 83,3; 100	mg/ml
Protéase	Caséine	0,0; 1,63; 3,25; 4,8; 6,5; 8,13; 9,75; 11,38; 13,0	mg/ml
Enzymes libres et combi-CLEA	Acétaminophène	0,0; 0,133; 0,266; 0,53; 1,06	μM

### 3.2.6 Préparation des solutions de contaminants (TrOC)

Pour chaque composé, une solution stock à 1 mg/ml a été préparée avec du méthanol (MeOH) de qualité analytique (pureté  $\geq 99\%$ ) comme solvant et conservée à  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 6 mois. À partir des solutions stocks, une solution mère combinée de 35 composés à  $10^4\text{ }\mu\text{g/l}$  de concentration finale pour chaque composé, a été préparée par dilution dans 1:1 (v/v)  $\text{H}_2\text{O/MeOH}$ . Les solutions mères étaient conservées à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pour une durée maximale de 3 mois, après quoi, elles sont renouvelées.

### 3.2.7 Test d'élimination des TrOC par les catalyseurs

Afin de déterminer le potentiel des différents catalyseurs pour l'élimination des TrOC en solution aqueuse, des échantillons de la solution mère ( $10^4\text{ }\mu\text{g/l}$ ) ont été incubés en mode batch avec des préparations de laccase (1000 U/l), du mélange d'hydrolases (amylase: 23 U/l, lipase: 20 U/l, cellulase: 377 FPU/l et protéase: 418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA. Les différents tests ont été réalisés à la température de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$  et ont duré 24 h. Le pH des solutions a été ajusté à 7 avec des solutions de HCl (100 mM) et NaOH (100 mM). Ainsi, pour les tests avec la laccase ou le mélange d'hydrolases, 50 ml de mélange réactionnel ont été préparés avec 10 ml de solution d'enzyme, 0,050 ml de solution mère des TrOC et 39,95 ml d'eau ultrapure. En ce qui concerne le traitement avec le combi-CLEA, un volume contenant l'équivalent de 5 mg de catalyseur solide sec, soit 300  $\mu\text{l}$ , a été ajouté à 0,050 ml de solution mère, le tout complété à 50 ml par de l'eau ultrapure. Les concentrations initiales des TrOC en début de réaction étaient  $10\text{ }\mu\text{g/l}$ . Dans les contrôles (blancs), les préparations de catalyseurs ont été remplacées par des volumes équivalents d'eau ultrapure. Durant toute la durée des réactions, les mélanges réactionnels ont été continuellement agités à 150 rpm. Les réactions ont été arrêtées par désactivation des catalyseurs en portant les mélanges réactionnels à  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes dans un bain d'eau. Afin de limiter l'effet de la photodégradation, tous les contenants, incluant ceux des contrôles ont été recouverts par du papier aluminium. Le rendement d'élimination des composés est exprimé par l'équation E5 :

$$R=100\times\left(1-\frac{C_t}{C_{bt}}\right) \quad \text{E5}$$

R, rendement d'élimination en pourcent (%)

$C_t$ , concentration résiduelle du composé après le traitement

$C_{bt}$ , concentration résiduelle du même composé dans le blanc (sans catalyseur) après le temps de traitement

### 3.2.8 Stabilité des enzymes par rapport au milieu réactionnel

La stabilité des enzymes a été déterminée après leur exposition au milieu réactionnel (eau ultrapure polluée avec les contaminants), pendant 24 h d'incubation, à 22 °C et au pH 7. Pour chaque enzyme libre et le combi-CLEA, la stabilité a été évaluée (en pourcent) en calculant le rapport de l'activité résiduelle après incubation à l'activité initiale, multiplié par 100.

### 3.2.9 Impact du pH, de la température et du temps de contact

Précisons que la composition des mélanges réactionnels est identique à celle des solutions préparées lors des tests visant à déterminer le potentiel des catalyseurs pour l'élimination des TrOC. Afin de déterminer l'impact du pH, de la température et du temps de contact sur l'élimination des TrOC, respectivement deux de ces trois paramètres ont été gardés constants, tout en variant le troisième. Les différentes combinaisons testées pour ces paramètres sont présentées dans le tableau 3.3. Les pH désirés ont été ajustés avec des solutions de HCl (100 mM) ou NaOH (100 mM) et les températures ont été maintenues constantes, par conservation des solutions dans un bain thermostaté (30 °C), sur les plans de travail du laboratoire (22 °C) et au frigo (4 °C).

**Tableau 3. 3 Différentes combinaisons de pH, de température et de temps de contact testées**

Impact étudié	pH	Température (°C)	Temps de contact (h)
Impact du pH	6; 7; 8	22	24
Impact de la température	7	4; 22; 30	24
Impact du temps de contact	7	22	0,5; 1; 2; 4

Le choix des valeurs du pH et de la température testées s'est fondé sur des données d'études précédentes et sur les conditions réelles existantes dans les eaux usées municipales, les eaux de surface et les eaux souterraines ainsi que sur les normes réglementaires en matière de rejet d'eaux usées au Canada et au Québec. En effet, au Québec, les normes de rejet réglementaires à l'effluent d'une station d'épuration fixent les valeurs du pH entre 6 et 9,5 (MELCC, 2019). Par ailleurs, une étude réalisée par Santé Canada entre 2009 et 2010 portant sur 129 échantillons d'eau brute place les valeurs du pH entre 4,6 à 8,57 dans 93 échantillons d'eau de surface et 6,1 à 9,18 dans 36 échantillons d'eau souterraine (Santé Canada, 2012).

### 3.2.10 Extraction en phase solide des TrOC

Préalablement aux extractions en phase solide, les échantillons (d'un volume de 50 ml) y compris les contrôles ont été successivement filtrés avec un filtre de verre de 1,2  $\mu\text{m}$  et un filtre en nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ , puis leur pH a été ajusté à 6,5 par des solutions de HCl (100 mM) ou NaOH (100 mM). Les molécules d'intérêt ont été extraites à l'aide de cartouches C<sub>18</sub> OASIS type HLB de 60 mg, 3 cc (de Waters Inc., Milford, MA). Tout d'abord, les cartouches ont été preconditionnées avec 5 ml de solvant 1:1 (v/v) MeCN/MeOH et équilibrées avec 5 ml d'eau ultrapure, pH 6,5. Les échantillons ont été alors chargés et passés à raison d'une goutte par seconde environ avec une pompe à vide. Ensuite, les cartouches sont lavées deux fois avec 5 ml d'eau ultrapure, pH 6,5, passée par gravité. Puis, les molécules ont été éluées avec 5 ml de solvant 1:1 (v/v) MeCN/MeOH. Subséquemment, les éluats sont passés sous un léger courant d'azote (N<sub>2</sub>) jusqu'à évaporation totale avant d'être reconstitués dans 5 ml de phase mobile 4:1 (v/v) H<sub>2</sub>O/MeOH. Un volume de 1,2 ml des solutions reconstituées est filtré avec un filtre PTFE de 0,2  $\mu\text{m}$  dans des flacons standards de verre ambré de 2 ml (12x32 mm) pour l'analyse UPLC. Tous les échantillons ont été préparés et analysés en triplicatas.

### 3.2.11 Quantification des molécules d'intérêt par UPLC/MS/MS

La séparation des molécules d'intérêt a été réalisée avec un équipement UPLC, *Acquity UPLC system*, avec une colonne en phase inverse C<sub>18</sub> HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ , 2,1x50 mm (de Waters, USA). Ce dispositif a été couplé à un spectromètre de masse quadripôle en tandem, *Acquity UPLC XEVO TQ Detector* (de Waters Corporation, Milford, MA), pour l'analyse et la quantification des molécules. La quantification des molécules a été réalisée par électro-nébulisation en mode positif MS/MS-ESI (+). Les phases mobiles étaient constituées d'eau + 0,1 % d'acide formique (H<sub>2</sub>O + 0,1 % AF) et de méthanol + 0,1 % d'acide formique (MeOH + 0,1 % AF). Les paramètres de détermination des molécules étaient les suivants : tension de cône, 20 V, tension de capillarité, 2,5 kV, température de la source, 150 °C, température de désolvatation, 450 °C, gaz de désolvatation, azote (N<sub>2</sub>) à 800 l/h, gaz de cône, azote (N<sub>2</sub>) à 50 l/h et gaz de collision, argon (Ar) à 0,38 ml/h.

## 3.3 Résultats et discussions

La présente section expose et discute les résultats des expériences réalisées en deux principales parties. En premier lieu, les résultats relatifs aux paramètres cinétiques des enzymes, aux taux de récupération d'activités enzymatiques de la combi-CLEA ainsi que de la stabilité de tous les catalyseurs sont présentés et discutés. En deuxième partie, les résultats des tests l'élimination des TrOC, de l'impact du pH, de la



température et du temps de contact sont présentés, analysés et discutés. Enfin, une synthèse conclut cette section.

### 3.3.1 Rendements d'immobilisation enzymatique de la combi-CLEA

Le tableau 3.4 présente les activités apparentes et les rendements d'immobilisation de la combi-CLEA. En dehors de la lipase qui affiche une hyperactivation (663,3 %), les rendements de récupération d'activités enzymatiques se situent entre 25,5 % et 49,2 %. Il est important de souligner que lors de la formation de ce catalyseur, les conditions du milieu, en l'occurrence le pH, la température et les concentrations d'enzymes, de l'agent précipitant et de l'agent de réticulation n'ont pas été optimisées. De plus, les préparations d'enzymes initiales utilisées n'ont pas subi de traitements de purification préalables. Ces traitements sortent du cadre de cette recherche.

**Tableau 3. 4 Activités de la combi-CLEA et rendements d'immobilisation<sup>a</sup>**

Enzymes	Activité (U.g <sup>-1</sup> )	Rendement (%)
Laccase	26,0 ± 1,1	25,5
Amylase	163,1 ± 7,2	49,2
Lipase	5,2 ± 0,01	663,3
Cellulase	ND	ND
Protéase	18,6 ± 1,7	30,5

<sup>a</sup> Moyenne de triplicatas ± écart-type. ND : non déterminé

Avec 26 U/g, la combi-CLEA présente un rendement d'immobilisation de 25,5 % pour l'activité spécifique de la laccase. Ce résultat est à rapprocher de ceux issus de certaines autres études trouvées dans la littérature. Par exemple, Touahar et al. (2014) ont obtenu un rendement d'activité du même ordre de grandeur (27,7 %) avec le sulfate d'ammonium comme agent de précipitation suivi de la réticulation avec le chitosan dans 0,1 M de 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDAC) comme agent de réticulation. D'Annibale et al. (1999) ont obtenu un rendement d'immobilisation (45 %) en immobilisant la laccase sur le chitosan avec le glutaraldéhyde comme agent de réticulation. En optimisant les conditions de préparation, Cabana, Jones et al. (2007) ont atteint un rendement d'immobilisation de 60,2 % avec le polyéthylène glycol (PEG) comme agent précipitant et le glutaraldéhyde comme agent de réticulation.

Schoevaart et al. (2004) ont synthétisé des CLEA de plusieurs enzymes dont la lipase de *Candida antarctica* et la trypsine avec le glutaraldéhyde comme agent de réticulation. Ces auteurs ont noté une hyperactivation du CLEA de lipase avec des concentrations finales de GLA jusqu'à 150 mM, alors que l'alcool

déshydrogénase était complètement désactivé à partir de seulement 10 mM de GLA. Ainsi, le CLEA formé à partir de la lipase de *Candida antarctica* a démontré une hyperactivation de 177 % entre les étapes de l'agrégation et de la réticulation avec le sulfate d'ammonium comme agent de précipitation et le glutaraldéhyde comme agent de réticulation. Toutefois, Guauque Torres et al. (2013) n'ont abouti qu'à un rendement de 11,1 % de récupération d'activité spécifique de la lipase de *Thermomyces lanuginosa* en utilisant les mêmes agents de précipitation et de réticulation. En général, l'hyperactivation de la lipase est probablement due à une modification de la structure 3D de cette enzyme et/ou du changement du microenvironnement (Cao, 2003).

Dans la présente étude, comme le montre le tableau 3.4, le rendement d'immobilisation de la protéase a été déterminé à 30, 5 %. Ce résultat semble en concordance avec les résultats de Schoevaart et al. (2004) où, l'immobilisation de la trypsine avec 2 mg/ml de sulfate d'ammonium comme agent de précipitation et 100 mM de GLA a abouti à un rendement de 27 % entre l'étape de l'agrégation et la réticulation.

Somme toute, les divers rendements d'immobilisation obtenus sont fortement dépendants de la nature des différentes enzymes ainsi que des conditions du milieu (ex. : pH, température, concentrations d'enzymes, d'agents de précipitation et de réticulation) et du microenvironnement.

### **3.3.2 Paramètres cinétiques des catalyseurs**

Les tableaux 3.5 et 3.6 présentent respectivement les paramètres cinétiques de Michaelis-Menten déterminés pour les enzymes libres et la combi-CLEA en utilisant les substrats spécifiques. Hormis la lipase, les vitesses maximales ( $V_{max}$ ) des enzymes libres sont supérieures à celles obtenues avec la combi-CLEA. Pour catalyseur insolubilisé, la laccase et la lipase ont exhibé une meilleure affinité à leurs substrats respectifs avec des valeurs du coefficient de Michaelis-Menten  $K_m$  inférieures à celles des enzymes libres correspondantes. En ce qui concerne l'amylase et la protéase, les valeurs de  $K_m$  de la combi-CLEA (436  $\mu\text{g/ml}$  pour l'amylase et 550  $\mu\text{g/ml}$  pour la protéase) sont supérieures à celles des enzymes libres, mais ces valeurs restent sensiblement proches (410  $\mu\text{g/ml}$  et 540  $\mu\text{g/ml}$  respectivement pour l'amylase et la protéase sous formes libres). Cette situation pourrait être reliée à l'utilisation et la concentration du glutaraldéhyde comme agent réticulant. En effet, en fonction du choix et de la concentration de l'agent réticulant, certaines enzymes peuvent être désactivées alors que d'autres pourraient être hyperactivées (Cabana, Jones, et al., 2007; D'Annibale, Rita Stazi, Vinciguerra, Di Mattia et Giovannozzi Sermanni, 1999; Schoevaart et al., 2004). D'après ces auteurs, une autre explication probable de ce phénomène s'avère être les effets du microenvironnement du catalyseur.

**Tableau 3. 5 Paramètres cinétiques des enzymes libres avec les substrats spécifiques à 22 °C et pH 7**

Enzymes	Vmax (μM/min)	Km	R <sup>2</sup>
Laccase	1115	522 μM	0,983
Amylase	3732	410 μg/ml	0,883
Lipase	43	1109 μM	0,866
Cellulase	ND	ND	ND
Protéase	631	540 μg/ml	0,952

**Tableau 3. 6 Paramètres cinétiques de la combi-CLEA avec les substrats spécifiques à 22 °C et pH 7<sup>a</sup>**

Enzymes	Vmax (μM/min)	Km	k <sub>cat</sub> (μmol s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> K <sub>m</sub> <sup>-1</sup> (l s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
<b>Laccase</b>	804	404 μM	83,65±19,65	0,20705±0,05	0,963
<b>Amylase</b>	3123	436 μg/ml	6,97±1,70	0,01599±0,004	0,911
<b>Lipase</b>	120	960 μM	1,26±0,24	0,00131±0,0003	0,972
<b>Cellulase</b>	ND	ND	ND	ND	ND
<b>Protéase</b>	424	550 μg/ml	0,60±0,15	0,00109±0,0003	0,925

<sup>a</sup> Moyenne de triplicatas ± écart-type

\* k<sub>cat</sub> K<sub>m</sub><sup>-1</sup> en μM s<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>

Les tableaux 3.7 à 3.9 présentent les paramètres cinétiques des enzymes libres et de la combi-CLEA calculés lors des essais d'élimination de l'acétaminophène comme substrat modèle, d'abord utilisé seul en solution puis en solution contenant 35 TrOC. Pour ce faire, dans les deux cas, les concentrations d'acétaminophène en solution ont été variées comme il est précédemment indiqué dans le tableau 3.2 ci-avant.

**Tableau 3. 7 Paramètres cinétiques des enzymes libres lors de l'élimination de l'acétaminophène seul en solution à 22 °C et pH 7<sup>a</sup>**

Enzymes	Vmax (μM/min)	Km (μM)	R <sup>2</sup>
Laccase libre	0,31x10 <sup>-3</sup>	0,26	0,975
Mélange d'hydrolases libres	0,26x10 <sup>-3</sup>	0,29	0,986

<sup>a</sup>Moyenne de duplicatas.

**Tableau 3. 8 Paramètres cinétiques des enzymes libres lors de l'élimination de l'acétaminophène en solution contenant 35 TrOC à 22 °C et pH 7<sup>β</sup>**

Enzymes	Vmax (μM/min)	Km (μM)	R <sup>2</sup>
Laccase libre	0,32x10 <sup>-3</sup>	0,27	0,976
Mélange d'hydrolases	0,62x10 <sup>-3</sup>	0,58	0,989

<sup>β</sup> Moyenne de duplicatas.

Lors du traitement de l'acétaminophène seul en solution, les vitesses maximales de réaction (Vmax) et les constantes de Michaelis-Menten (Km) sont similaires pour la laccase et le mélange d'hydrolases sous formes libres. De plus, lors du traitement avec la laccase, Vmax et Km sont identiques dans les deux cas où l'acétaminophène était seul en solution et en solution contenant 35 TrOC. Lors de l'élimination de l'acétaminophène en solution contenant 35 TrOC avec le mélange d'hydrolases libres, Vmax est supérieure à deux fois celle obtenue avec l'acétaminophène seul en solution. La valeur de Km relatif au cas du traitement de l'acétaminophène en solution de 35 TrOC avec ce même mélange d'hydrolases libres s'est montrée 2 fois plus élevée que celle calculée pour le traitement de l'acétaminophène seul en solution.

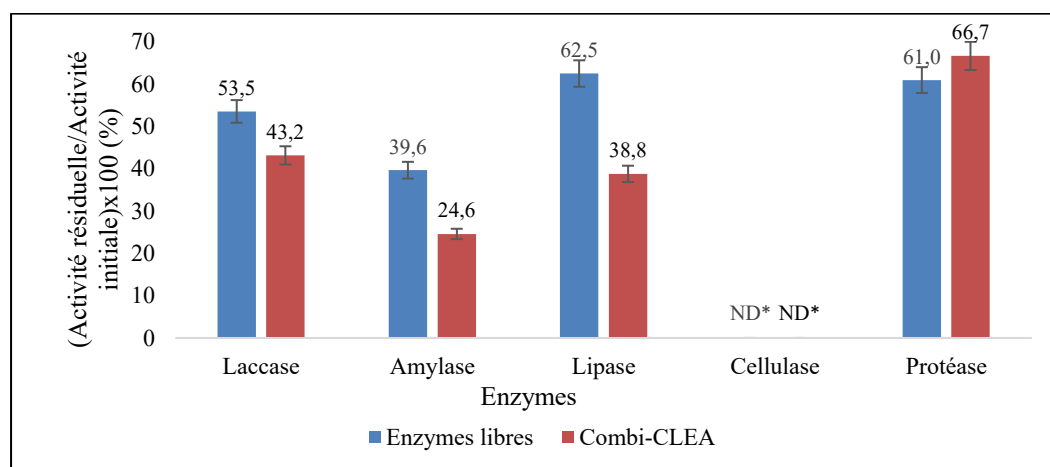
Globalement, les valeurs de Vmax obtenues lors du traitement de l'acétaminophène seul en solution et en solution contenant 35 TrOC avec le combi-CLEA sont de 2 à 4 fois inférieures aux valeurs obtenues lors des traitements avec la laccase et le mélange d'hydrolases sous formes libres. Il se peut que dans ce cas, la combi-CLEA présente une conformation spatiale (structure 3D) rigidifiée, bloquant les enzymes dans une position qui limite l'accès de leurs sites actifs à la molécule d'acétaminophène. Cependant, les valeurs de Km sont similaires pour tous ces catalyseurs, lors du traitement de l'acétaminophène en solution de 35 TrOC, mises à part les valeurs de Km obtenues avec le mélange d'hydrolases. Dans ce dernier cas, Km était deux fois plus élevé avec le mélange libre qu'avec le combi-CLEA pour le même type traitement, traduisant une meilleure affinité du combi-CLEA à l'acétaminophène. Finalement, il peut être déduit de ces observations des effets de compétition entre l'acétaminophène et d'autres substrats dans le mélange.

**Tableau 3. 9 Paramètres cinétiques de la combi-CLEA lors de l'élimination de l'acétaminophène seul en solution et en solution contenant 35 TrOC à 22 °C et pH 7**

Substrats	Vmax (μM/min)	Km (μM)	kcat (μmol s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	kcat K m <sup>-1</sup> (l s <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
ACT seul en solution	0,14x10 <sup>-3</sup>	0,32	1,4x10 <sup>-7</sup>	2,8x10 <sup>-7</sup>	0,944
ACT en solution contenant 35 composés	0,18x10 <sup>-3</sup>	0,31	1,7x10 <sup>-7</sup>	4,9x10 <sup>-6</sup>	0,938

### 3.3.3 Stabilité des enzymes

La figure 3.1 présente les résultats de l'étude de la stabilité des enzymes libres et du catalyseur insolubilisé (combi-CLEA) après leur incubation pendant 24 h, à 22 °C et au pH 7 avec des échantillons de l'effluent synthétique. Après 24 h de traitement, en dehors de la protéase de la combi-CLEA avec 66,7 % contre 61 % dans le mélange sous formes libres, globalement, les enzymes libres ont montré une meilleure stabilité par rapport à la combi-CLEA. Ainsi, les pourcentages relatifs d'activité résiduelle par rapport l'activité initiale des enzymes libres varient de 39,6 % (amylase) à 62,5 % (lipase) contre 24,6 % pour l'amylase à 66,7 % pour la protéase dans la combi-CLEA. Les résultats obtenus par Arsenault, Cabana et Jones (2012) pointent vers la même tendance en étudiant la stabilité d'un CLEA de laccase après 24 h d'incubation dans un effluent réel.



**Figure 3. 1 Stabilité des enzymes libres et de la combi-CLEA après 24 h d'incubation avec l'eau usée synthétique à 22 °C et au pH 7.**

\*ND : Non déterminé.

### 3.3.4 Potentiel d'élimination des TrOC

La figure 3.2 présente les résultats d'élimination des 22 composés d'intérêt par les préparations de laccase libre (a), du mélange d'hydrolases libres (b) et de la combi-CLEA (c) après un traitement de 24 h, à 22 °C et au pH 7. Schématiquement, trois domaines d'efficacité d'élimination peuvent être considérés, soit élevé (70 % à 100 %), modéré (40 % à 69 %) et faible (0 % à 39 %).

Avec la laccase libre, la sulfaméthazine (100 %) et l'acétaminophène (99 %) ont été entièrement éliminés après 24 h de traitement à 22 °C et au pH 7. De plus, la lévothyroxine (87 %), la lincomycine (82 %), l'atorvastatin (82 %), le triméthoprim (79 %), le sulfaméthoxazole (70 %) et le venlafaxine (68 %) ont exhibé des rendements d'élimination élevés.

Par contre, le 1,7 diméthylxanthine (23 %), le 5-méthyl-1H-benzotriazole (29 %), le ramipril (35 %), la caféine (36 %) et l'azithromycine (36 %) ont été plus faiblement dégradés.

La simplicité de la structure de la molécule de l'acétaminophène doublée de la présence du groupe donneur d'électrons (-OH) sur un noyau aromatique expliquerait que cette molécule soit bien dégradée par la laccase. Un rendement similaire (95 %) a été obtenu avec la laccase de *T. versicolor* (Touahar, Haroune, Ba, Bellenger et Cabana, 2014). Se fondant sur cette hypothèse, on s'attendrait que le deuxième composé phénolique, l'oxybenzone soit aussi bien éliminé. Cependant, son élimination n'a été que de 64 %. Asif et al. (2018) ont pu obtenir 95 % d'élimination du même composé, mais avec deux paramètres d'opération bien différents de ceux de cette étude, c'est-à-dire, 60 h de traitement et une solution de concentration initiale de 20 µg/l. La présence chez l'oxybenzone, en position ortho, d'une cétone benzénique, groupe fortement accepteur d'électrons, mais absent chez l'acétaminophène, pourrait expliquer le fait que cette molécule soit moins enlevée. De plus, cette présence même de la cétone pourrait causer l'encombrement stérique autour du groupe phénol et réduire ainsi l'efficacité d'oxydation par la laccase.

Globalement, la situation est différente en ce qui concerne les rendements d'élimination importants observés pour les autres composés. Pour la sulfaméthazine et le sulfaméthoxazole, en plus des groupes sulfonamides moyennement accepteurs d'électrons, ces molécules renferment chacune un groupe amine, fort donneur d'électrons. Le rendement d'élimination de la sulfaméthazine est proche de celui obtenu par García-Galán et al. (2011) lors d'un traitement de 20 h en mode batch d'une solution de concentration initiale 9 mg/l, soit plus de 95 %. La lévothyroxine et l'atorvastatin (avec des groupes amide, amine, halogène et carboxyle) ainsi que la lincomycine (avec des groupes méthyle, halogène, amine et amide) portent quant à eux, une combinaison de groupes aux actions opposées. De plus, l'importance relative des effets (résonance ou induction) de ces différents groupes pourrait jouer un rôle important. Par conséquent, il serait difficile de conclure à un modèle ou mécanisme de réaction unique. Des études spécifiques approfondies au cas par cas seraient nécessaires pour établir une meilleure explication des mécanismes de dégradation de ces molécules. Cependant, la capacité de la laccase à oxyder des substrats non phénoliques (Yang et al., 2013) ainsi que des thiols aromatiques est une explication possible (Rao et al., 2010). Par ailleurs, la formation de radicaux polymériques par oxydation des produits parents par réactions croisées au sein des mêmes molécules ou avec d'autres molécules, de même que la possibilité de réactions de déshalogénéation, de déméthoxylation ou de décarboxylation sont tout autant susceptibles de contribuer à ces rendements (Rao et al., 2010). Finalement, pour soutenir cette hypothèse, certaines études ont effectivement démontré la formation de radicaux libres lors du traitement par la laccase de composés phénoliques tels que l'acétaminophène (Lu, Huang et Mao, 2009). La présence de ces radicaux ouvre ainsi la voie à d'autres réactions dans le mélange réactionnel.

La carbamazépine (48 %), l'atrazine (53 %) et le DEET (54 %) ont été plus modérément éliminés. Asif et al. (2018) ont attribué des taux d'enlèvement respectifs de 62 %, 57 % et 70 % à ces trois composés par la laccase au bout de 60 h de traitement, alors que Yang et al. (2013) ont souligné la résistance de ces mêmes composés aux traitements par des champignons responsables de pourriture blanche du bois et leurs systèmes LME (*Lignin Modifying Enzymes*). La résistance de la carbamazépine a été également rapportée lors de traitements enzymatiques par la laccase dans un réacteur (Rodríguez-Rodríguez et al., 2012; Yu, Ardao, Ma, Corvini et Agathos, 2015). Du point de vue de la structure moléculaire, la carbamazépine présente une structure aromatique tricyclique avec la présence d'un groupement carbox-amide. Hypothétiquement, la prédominance de l'effet du groupe carboxyle (fort accepteur d'électrons) pourrait expliquer la résistance de cette molécule. L'atrazine est un composé triazine contenant un groupe halogène (chlore) faible accepteur d'électrons et un groupe méthyle (-CH<sub>3</sub>), faible donneur d'électrons. Entre autres, le taux d'élimination de cette molécule peut être lié à une probable prépondérance de l'effet du chlore sur le groupe méthyle. Enfin, considérant la présence plusieurs composés en présence, les différents taux d'élimination observés pourraient être dus à des réactions croisées.

De même, le diazinon (40 %), la ciprofloxacine (47 %), l'amlodipine (55 %) et le chlorpyrifos (55 %) ont été moyennement enlevés après 24 h de traitement. Ici également, la structure moléculaire des composés, avec la présence de groupes accepteurs d'électrons tels que le chlore (chez le chlorpyrifos et l'amlodipine) pourrait expliquer ces rendements. Enfin, l'élimination modérée de la ciprofloxacine pourrait être attribuée aux groupes halogène (fluor) et carboxyle (-COOH), tous deux accepteurs d'électrons.

Les résultats préliminaires issus de cette étude traduisent une certaine efficacité du mélange d'hydrolases pour l'élimination des TrOC. En effet, ce mélange d'enzymes hydrolytiques sous formes libres a permis d'obtenir des rendements d'élimination élevés pour 13 des 22 composés testés. Ainsi, la venlafaxine (99 %), le triméthoprim (97 %), l'acétaminophène (96 %) et la sulfaméthazine (93 %) ont exhibé des rendements proches de l'élimination complète. Ils sont suivis du sulfaméthoxazole (89 %), de la lévothyroxine (89 %), de la lincomycine (87 %), de la diphényldramine (86 %), de l'atorvastatin (83 %), du chlorpyrifos (75%), de l'azithromycine (75 %), du 1,7 diméthylxanthine (71 %), de l'amlodipine (69 %) et du diazinon (68 %). Par contre, la caféine (8 %), le DEET (10 %), l'atrazine (23 %), la ciprofloxacine (35 %) et la carbamazépine (39 %) se sont montrés plus réfractaires à l'action du mélange d'hydrolases libres.

Globalement, ces résultats confirment le fait que l'hydrolyse constitue l'un des mécanismes prépondérants de dégradation des contaminants organiques dans un environnement aqueux (Jakimska, Śliwka-Kaszyńska, Nagórski, Namieśnik et Kot-Wasik, 2014). Spécifiquement, les composés possédant des fonctions sulfonamides et macrolides s'avèrent être prompts à la dégradation en présence d'hydrolases. Ainsi, les

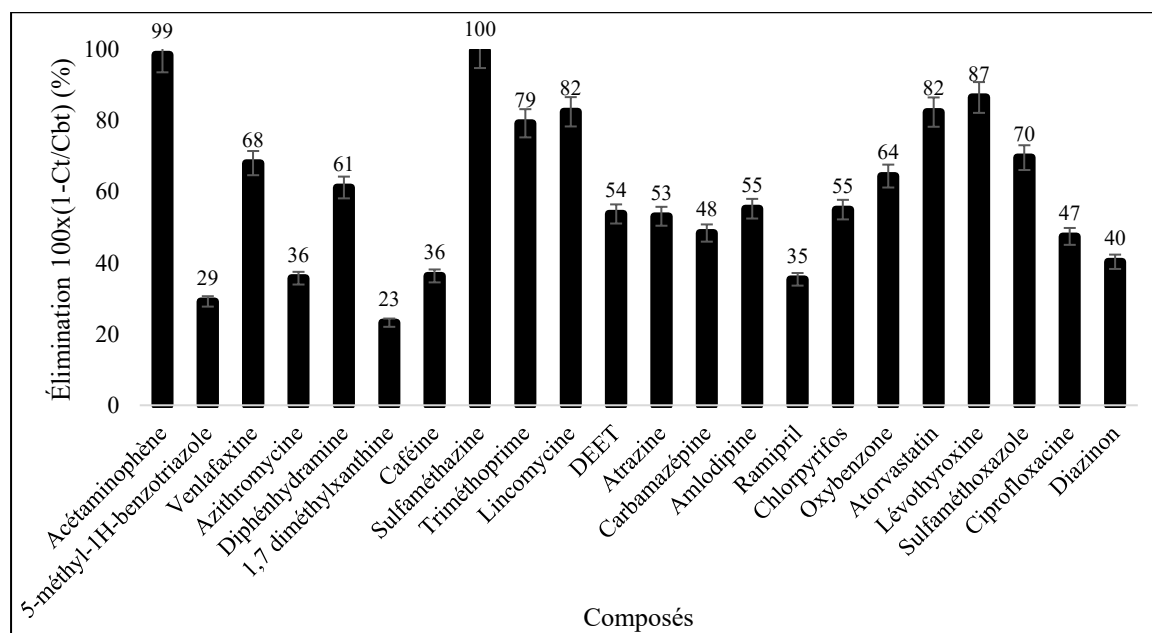
antibiotiques de type sulfonamide (sulfaméthazine et sulfaméthoxazole), de types lincosamide (lincomycine) et macrolide (azithromycine), et le triméthoprim figurent parmi les composés les mieux éliminés par ce mélange d'hydrolases. Ces résultats s'avèrent similaires à ceux obtenus par Yang et al. (2013). Fausse note pourtant, la ciprofloxacine a été faiblement enlevée. Peut-être que dans ce cas, la vitesse de réaction était faible pour une dégradation notable en 24 h de traitement. La présence de groupes esters dans la molécule de certains de ces composés, les a rendus propices à l'hydrolyse, en raison notamment de la présence de la lipase parmi les enzymes du mélange d'hydrolases. Ainsi, les insecticides phosphodiesteres structurellement proches, le chlorpyrifos et le diazinon ont exhibé des taux d'élimination importants (Hui, Ariffin et Tahir, 2010).

Les rendements d'élimination obtenus avec la combi-CLEA au bout de 24 h de traitement sont globalement moins importants que ceux atteints avec la laccase et le mélange d'hydrolases sous formes libres. Ainsi, l'acétaminophène (89 %), suivi du diazinon (61 %), de la lincomycine (60 %), de la diphénhydramine (59 %), de l'azithromycine (55 %) et du chlorpyrifos (52 %) ont exhibé les meilleurs rendements d'élimination. Pour tout le reste, les pourcentages d'élimination s'établissent entre 16 % et 45 % avec le DEET et l'oxybenzone les molécules les plus faiblement éliminées.

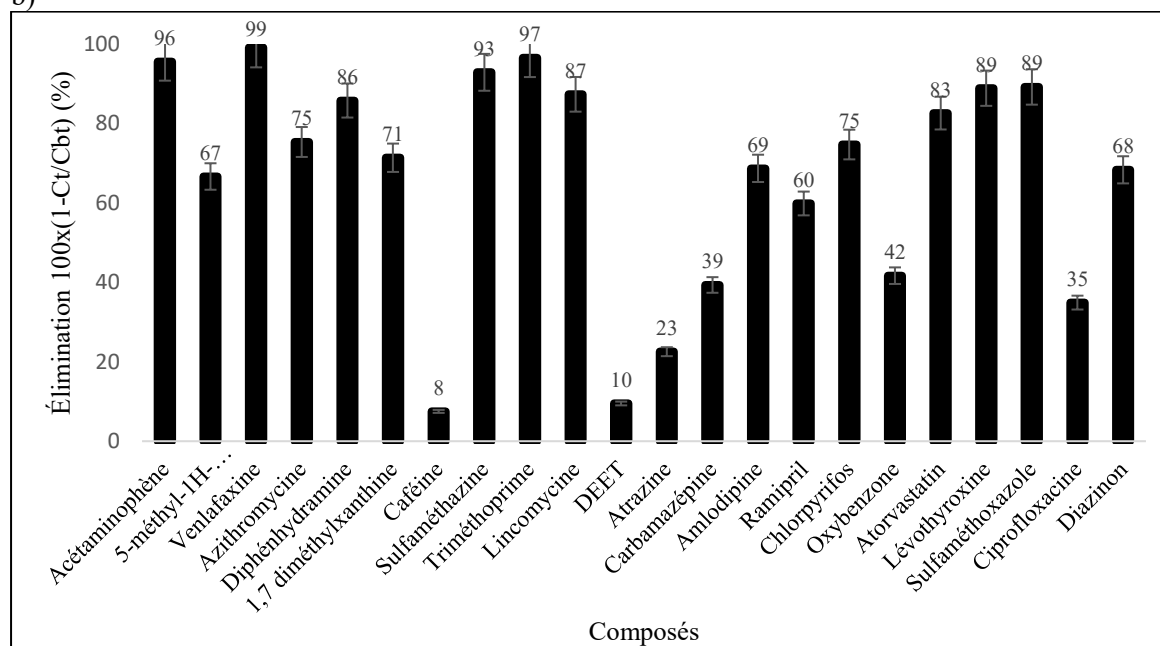
En théorie, la combi-CLEA devrait démontrer une combinaison (pas une addition) des performances catalytiques de la laccase et du mélange d'hydrolases. Cela dit, lors des différents traitements, les concentrations en activités des enzymes libres étaient initialement supérieures à celles de la combi-CLEA pour les mêmes concentrations de TrOC. Même si ce catalyseur insolubilisé ne démontre pas une franche amélioration des propriétés catalytiques, la laccase et la lipase ont exhibé des valeurs de  $K_m$  inférieures par rapport à leurs formes libres en utilisant leurs substrats spécifiques. Par hypothèse, pour ces deux catalyseurs, la combi-CLEA devrait mieux réagir avec moins de substrats que les enzymes libres correspondantes. Par contre, en raison d'une possible modification de la structure tridimensionnelle des enzymes lors de l'immobilisation et de l'effet d'encombrement stérique, l'accessibilité des sites actifs de certaines enzymes a pu être rendue davantage difficile. De plus, la stabilité apparente moindre de la combi-CLEA et le transfert de masse ( $K_m$ ) expliquent probablement les taux d'élimination moins élevés obtenus lors des traitements avec ce catalyseur insolubilisé. Une fois encore, l'optimisation des conditions de préparation de la combi-CLEA et des paramètres opératoires lors des tests d'élimination, aurait pu donner de meilleurs résultats.



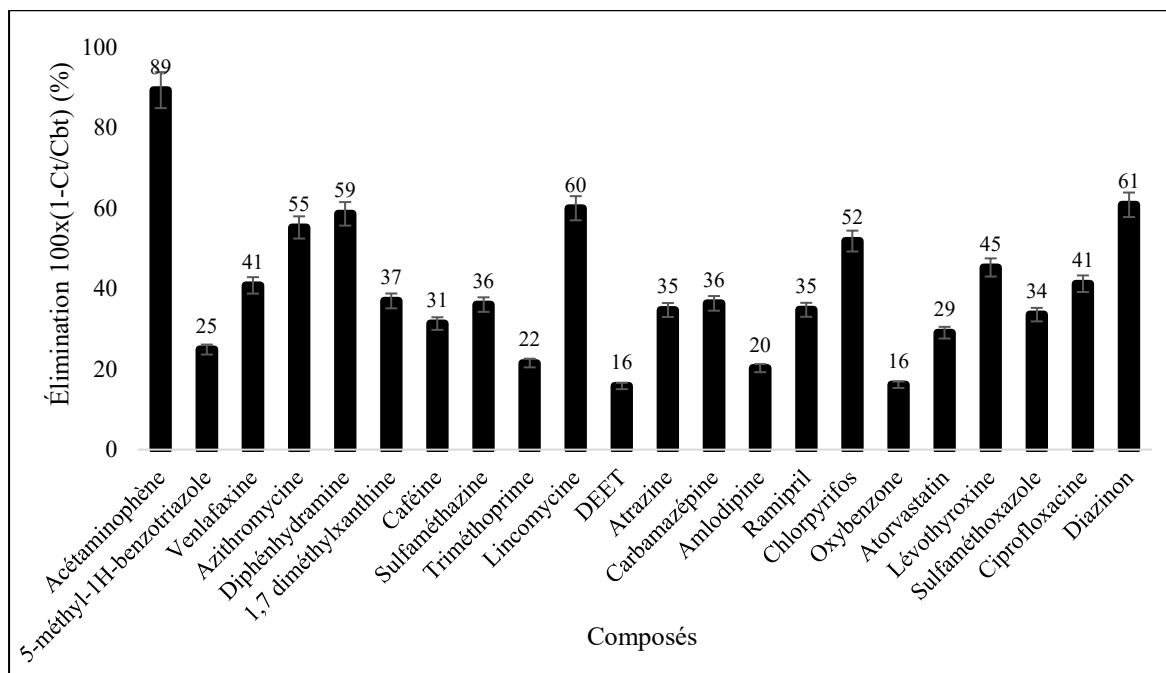
a)



b)



c)



**Figure 3. 2 Élimination des TrOC après 24 h de traitement à 22 °C, pH 7 par a) la laccase (1000 U/l), b) le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et c) 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g))**

### 3.3.5 Impact du pH, de la température et du temps de contact sur l'élimination des TrOC

Le pH, la température et le temps de contact peuvent modifier la structure et l'activité des enzymes en solution aqueuse (Brown, Dafforn, Fryer et Cox, 2013). Par conséquent, ces paramètres sont susceptibles d'influencer sensiblement l'élimination des composés organiques traités avec ces enzymes dans un milieu aqueux.

La figure 3.3 (a-h) présente les rendements d'élimination des TrOC aux pH 6, 7 et 8 par les préparations de laccase libre, du mélange d'hydrolases libres et de la combi-CLEA, au bout de 24 h de traitement et à 22 °C. Les profils d'élimination montrent que le mélange d'hydrolases a permis d'obtenir une élimination quasi complète de la venlafaxine (99 %, pH 6 et 7), de l'acétaminophène (96 %, pH 6 et 7), de la sulfaméthazine (97 %, pH 8) et du triméthoprim (97 % au pH 7 et 98 % au pH 6). Secondairement, les composés tels que le sulfaméthoxazole (92 %, pH 6), la lévothyroxine (90 %, pH 6), le 1,7 diméthylxanthine (85 %, pH 8), la lincomycine (89 %, pH 6), l'atorvastatin (83 %, pH 7), la diphénhydramine (86 %, pH 7), le diazinon (77 % au pH 6) et l'azithromycine (75 %, pH 7) ont été efficacement éliminés. Par contre, la caféine (8 % au pH 7 et 20 % au pH 6), le DEET (9 % au pH 6 et 10 % au pH 7), la carbamazépine (1 % au pH 6 et 39 % au pH 7)

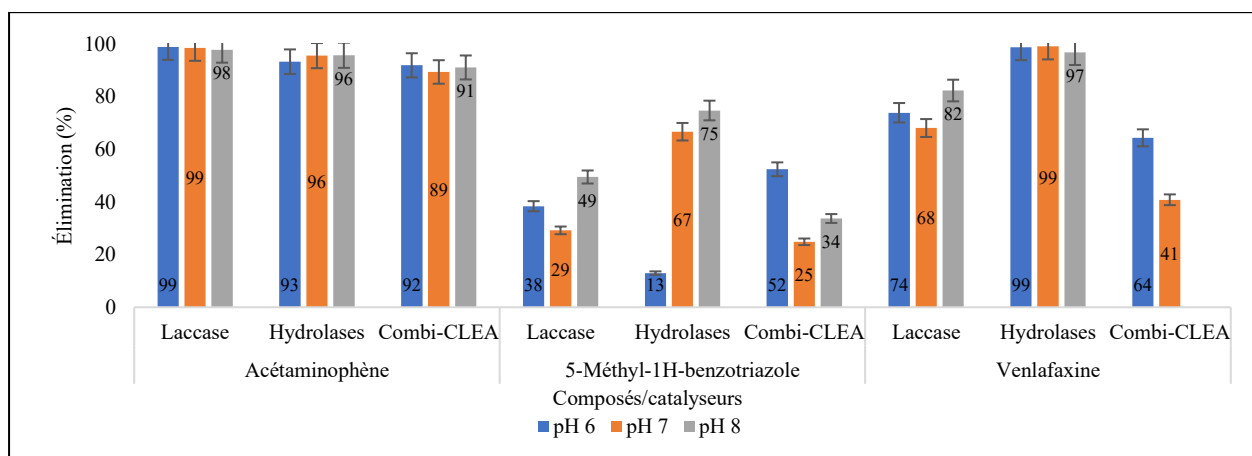
et moins l'atrazine (23 % au pH 7 et 49 % au pH 6), l'oxybenzone (27 % au pH 8 et 42 % au pH 7) ainsi que la ciprofloxacine (12 % au pH 6 et 56 % au pH 8) se sont montrés davantage réfractaires à l'action du mélange d'hydrolases libres.

Avec la laccase, les rendements d'élimination ont atteint 100 % pour la sulfaméthazine (pH 6, 7 et 8) et 99 % pour l'acétaminophène aux pH 6 et 7, tandis que la lévothyroxine (84 % au pH 6 et 87 % au pH 7), la diphénhydramine (82 % et 83 % aux pH 8 et 6 respectivement), la venlafaxine (82 %, pH 8), l'atorvastatin (75 % au pH 6 et 82 % au pH 7), la lincomycine (82 %, pH 7) et le triméthoprim (79 %, pH 7) ont exhibé des rendements d'élimination tout aussi importants. À l'opposé, le 1,7 diméthylxanthine et la caféine, deux composés structurellement proches se sont montrés récalcitrants au traitement avec la laccase libre avec des plages d'élimination respectives de 11 % (au pH 6) à 23 % (au pH 7) et de 14 % (au pH 6) à 36 % (au pH 7).

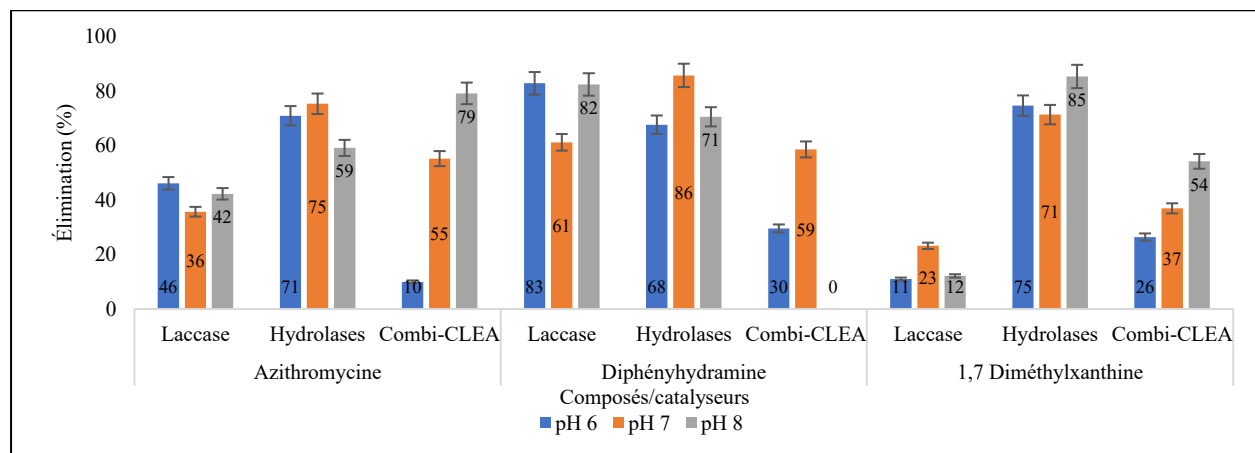
Globalement, en dehors de l'acétaminophène (89 % au pH 7 et 92 % au pH 6) et de l'azithromycine (79 % au pH 8), les rendements d'élimination avec la combi-CLEA sont moins élevés que ceux obtenus avec les enzymes libres après 24 h de traitement à 22 °C, aux pH 6, 7 et 8.

Finalement, les rendements d'élimination n'ont pas démontré une franche corrélation avec le pH des solutions. En effet, toutes les expériences ont été réalisées sur une courte bande de pH proche de la zone neutre (6-8). De plus, les échantillons ont été incubés pendant 24 h; cette durée paraît assez longue. Certains des catalyseurs pourraient être désactivés entretemps. La détermination de leur stabilité (activités résiduelles) pourrait permettre de voir si ceux-ci ont demeuré actifs tout au long du traitement. D'autre part, les composés pourraient avoir des temps d'élimination différents, mais inférieurs à 24 h. Ainsi, l'effet pH étudié est possiblement masqué par le facteur temps de contact.

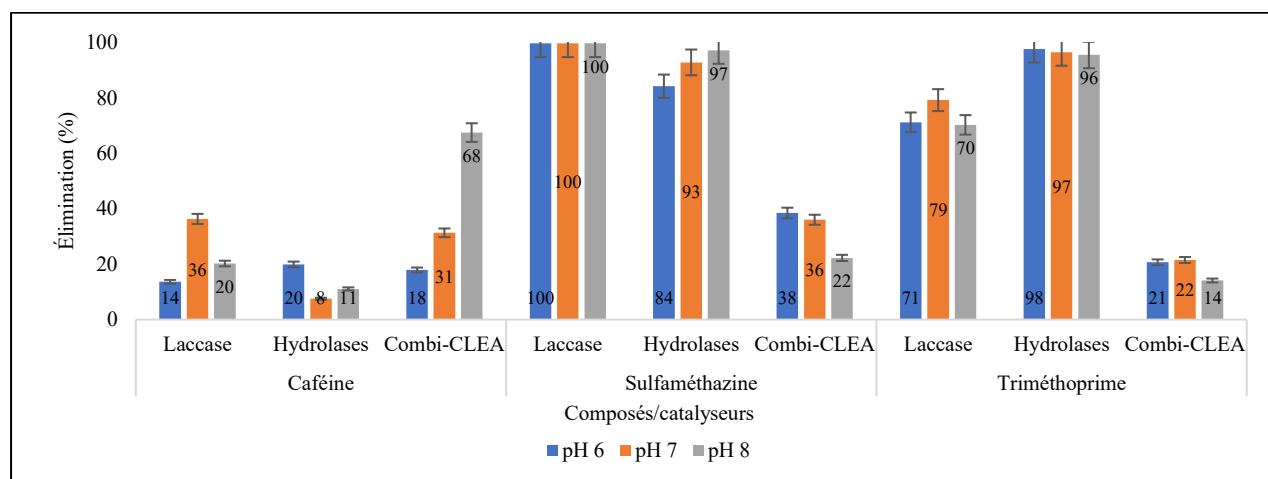
a)



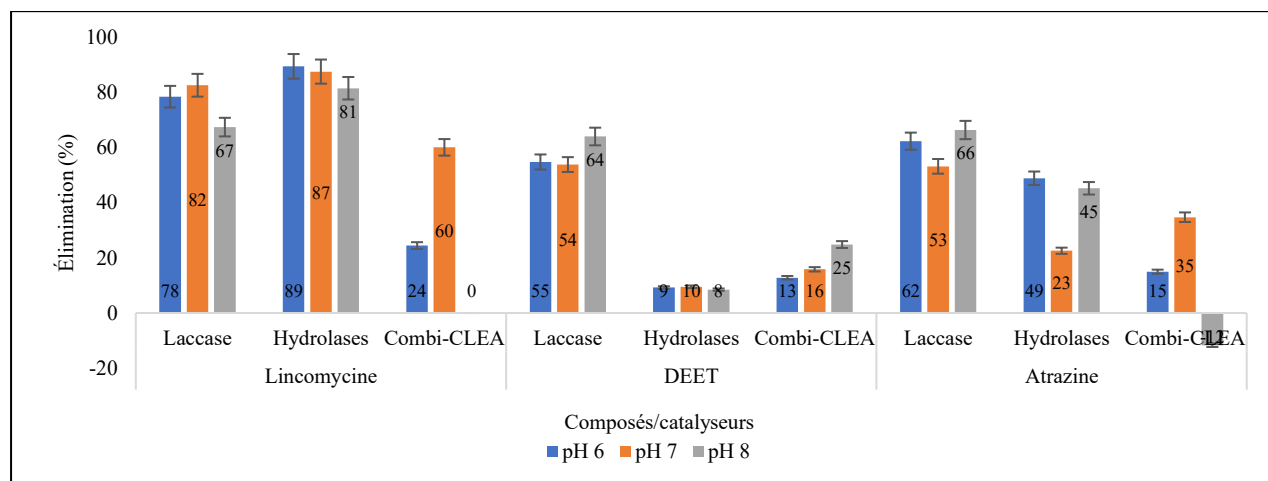
b)



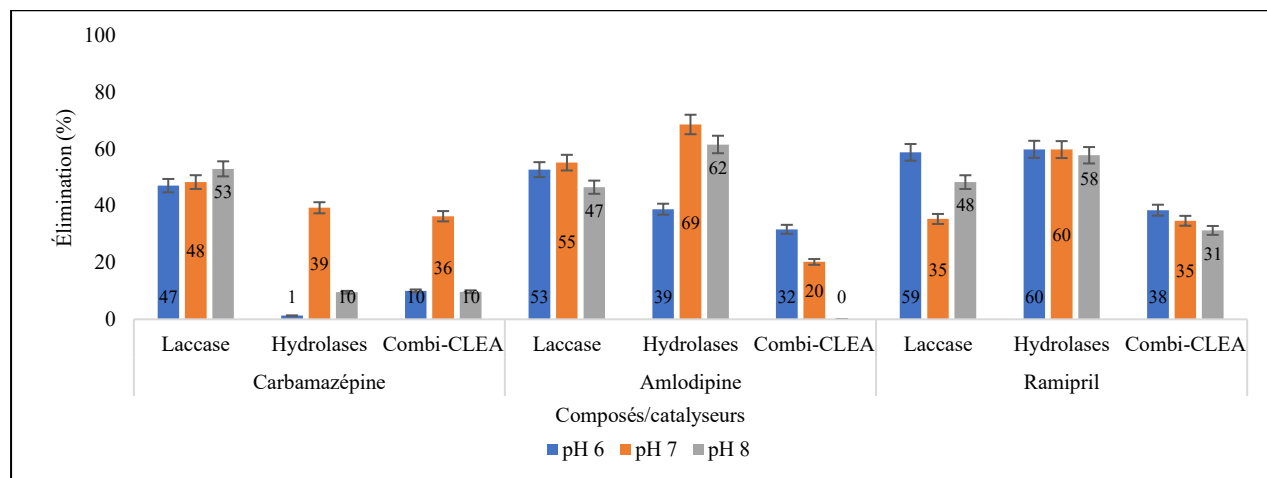
c)



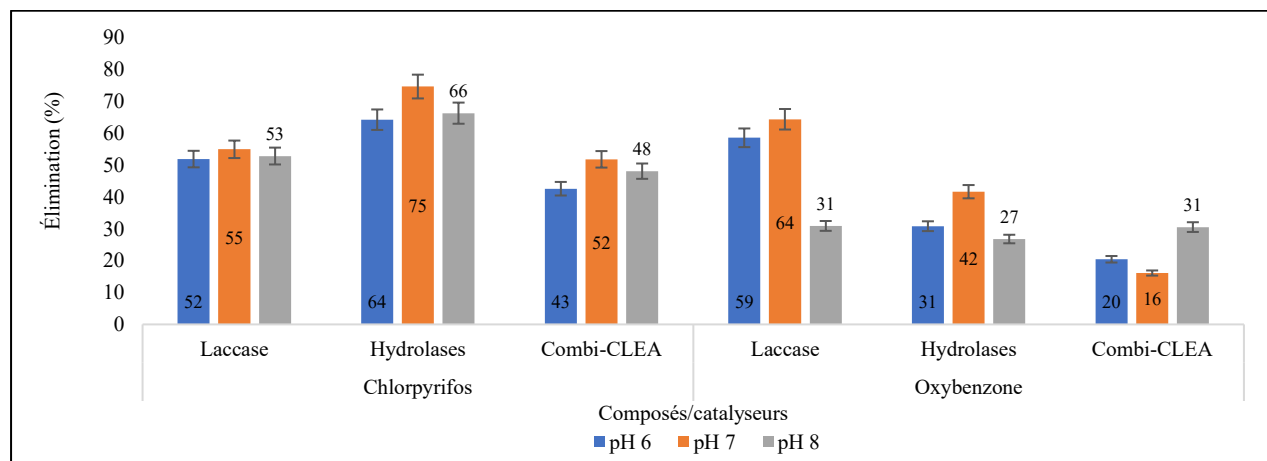
d)



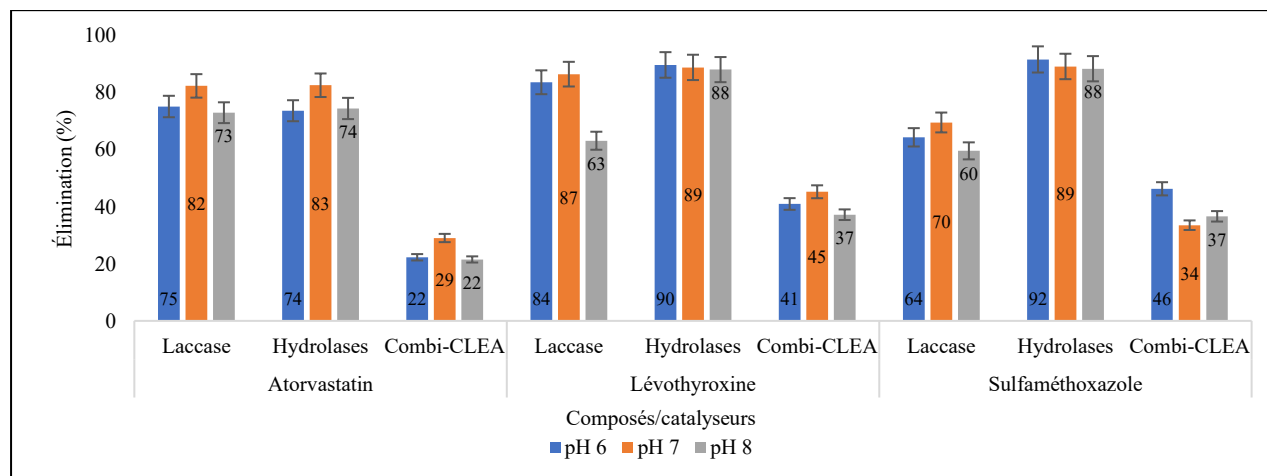
e)



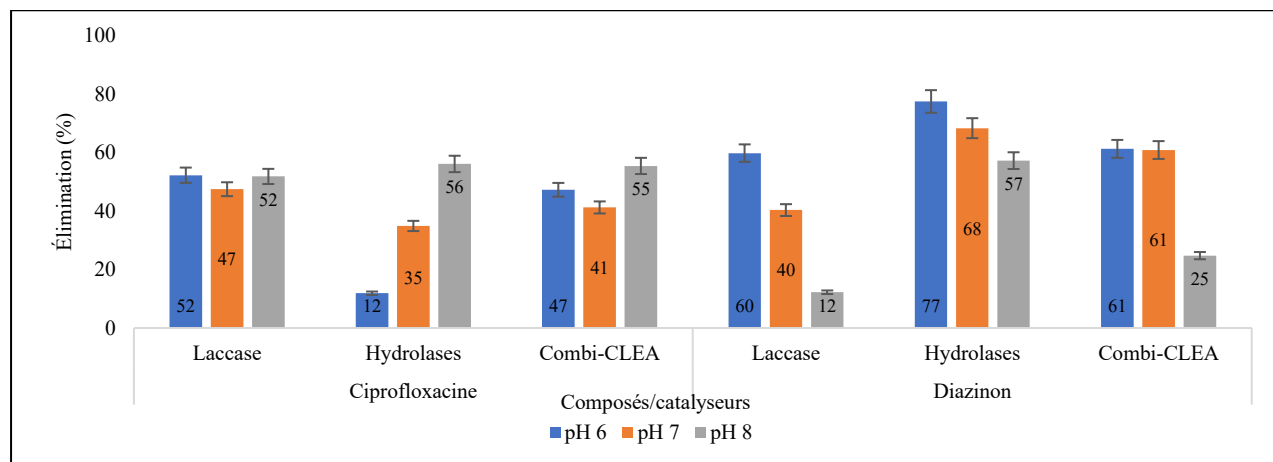
f)



g)



h)



**Figure 3. 3 Élimination des TrOC après 24 h de traitement à 22 °C, aux pH 6, 7 et 8, par laccase (1000 U/l), le mélange d’amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g))**

La figure 3.4 (a-f) montre l’impact de la température sur les rendements d’élimination des TrOC après un traitement de 24 h au pH 7. Trois valeurs de température ont été testées, soit 4 °C, 22 °C et 30 °C. Le traitement a été réalisé avec les mêmes préparations de laccase libre, du mélange d’hydrolases libres et de la combi-CLEA.

Comme le montre bien cette figure, en fonction de la température, la laccase s’est montrée efficace pour l’enlèvement de l’acétaminophène (93 % à 4 °C, 101 % à 30 °C et 102 % à 22 °C), de la sulfaméthazine (89 % à 4 °C, 92 % à 22 °C et 93 % à 30 °C), de la diphéhydramine (74 % à 4 °C, 84 % à 22 °C et 86 % à 30 °C), de l’amlodipine (86 % à 22 °C et 30 °C), de l’atorvastatin (72 % à 4 °C, 86 % à 22 °C et 82 % à 30 °C) et de la lévothyroxine (81 % à 22 °C et 82 % à 30 °C). Par contre, la caféine (23 % à 4 °C et 35 % à 30 °C), le 1,7 diméthylxanthine (26 % à 4 °C et 36 % à 30 °C) et la carbamazépine (19 % à 22 °C et 33 % à 30 °C) étaient moins bien éliminés par la laccase sous forme libre.

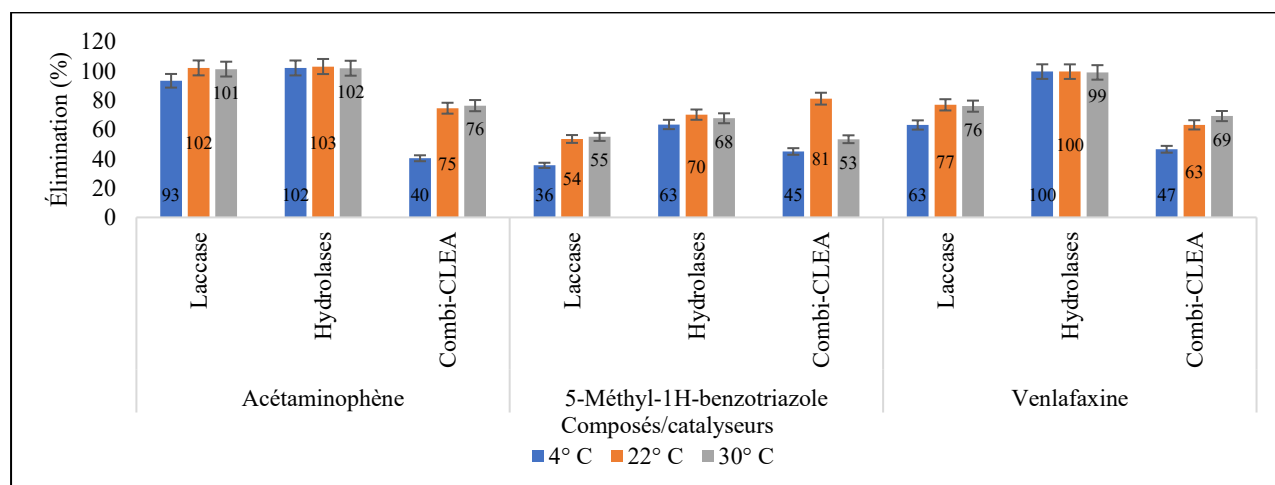
Le traitement avec le mélange d’hydrolases libres a exhibé une élimination complète de l’acétaminophène (>100 % à 4 °C, 22 °C et 30 °C), de la venlafaxine (100 % à 4 °C et 22 °C), du ramipril (100 % à 22 °C et 30 °C). De plus, avec 97 % (à 4 °C et 30 °C) et 99 % (à 22 °C) d’élimination, le triméthoprime, l’amlodipine (99 % à 22 °C), le sulfaméthoxazole (98 % à 22 °C et 30 °C), et dans une moindre mesure, la sulfaméthazine (91 % à 4 °C et 30 °C et 96 % à 22 °C), la diphenhydramine (90 % à 30 °C et 92 % à 22 °C), le 1,7 diméthylxanthine (90 % à 22 °C et 93 % à 30 °C) et la lincomycine (84 % à 4 °C, 91 % à 22 °C et 95 % à 30 °C) sont bien éliminés. Cependant, la caféine avec seulement 11 % d’élimination à 4 °C, 24 % à 22 °C

et 28 % à 30 °C, la carbamazépine (18 % à 4 °C et 29 % à 22 °C) et le DEET (26 % à 4 °C et 34 % à 22 °C) ont été faiblement éliminés par le mélange d'hydrolases libres.

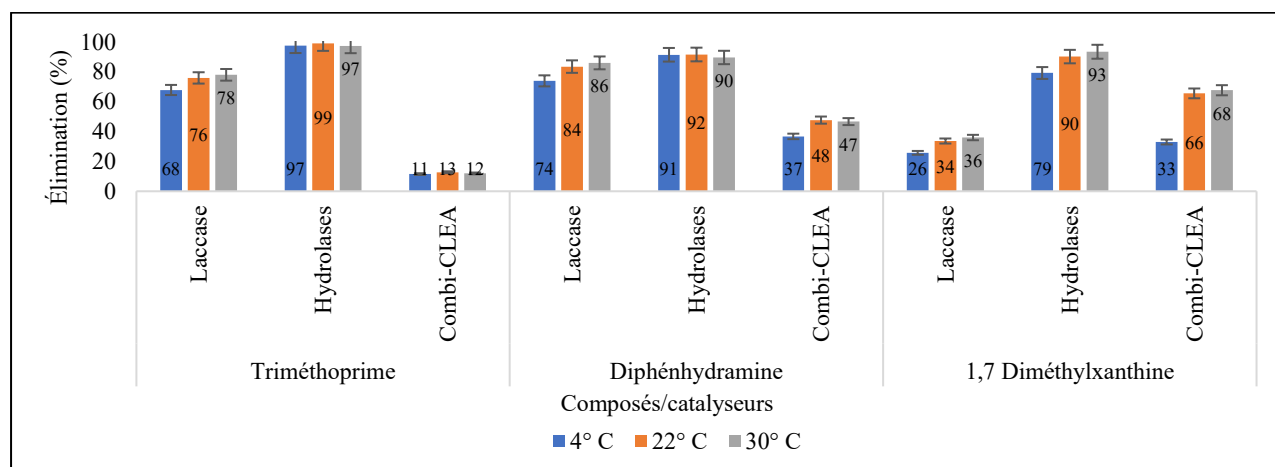
Finalement, le traitement avec la combi-CLEA a affiché des rendements d'élimination modérés pour un certain nombre de composés. Ainsi, par exemple, l'acétaminophène a été le plus éliminé (75 % à 22 °C et 76 % à 30 °C), suivi du 5-méthyl-1H-benzotriazole (45 % à 4 °C, 81 % à 22 °C et 53 % à 30 °C), de la venlafaxine (47 % à 4 °C, 63 % à 22 °C et 69 % à 30 °C), de la caféine (56 % à 22 °C, 48 % à 30 °C) et du 1,7 diméthylxanthine avec 68 % d'élimination à 22 °C et 30 °C, etc.

Globalement, les enzymes sous formes libres ont été plus actives que la combi-CLEA, notamment aux températures élevées (22 °C et 30 °C). De plus, qu'il s'agisse de enzymes libres ou de la combi-CLEA, les rendements d'élimination les plus importants ont été obtenus aux températures élevées (22 °C et 30 °C), les traitements à 22 °C ayant offert les meilleurs rendements. Pour compléter cette observation, la détermination de l'activité résiduelle de chaque catalyseur à la suite des traitements pourrait permettre de connaître leur stabilité à ces températures et éclairer davantage la compréhension de l'impact de la température.

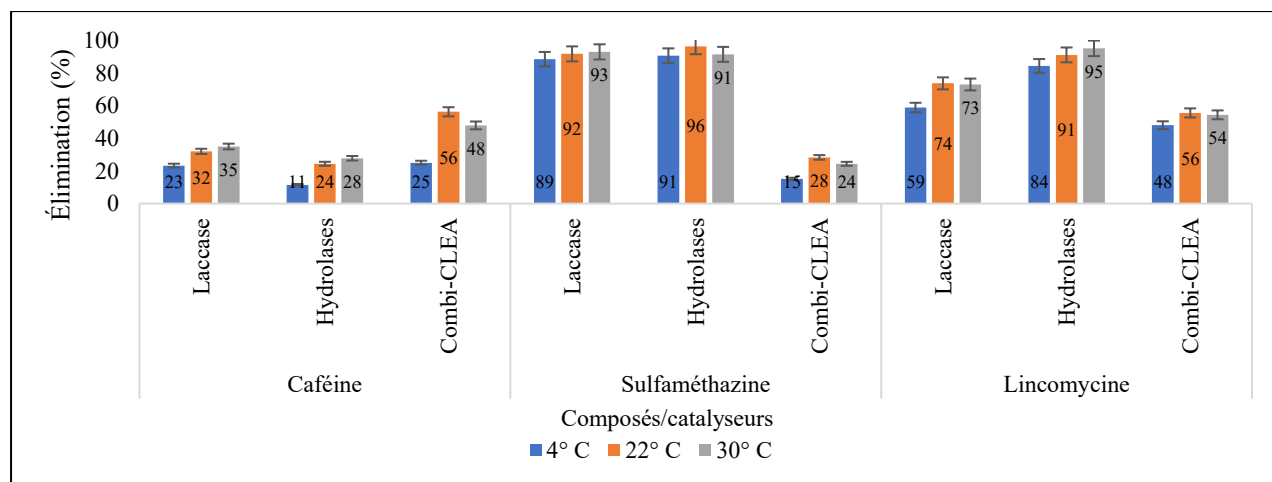
a)



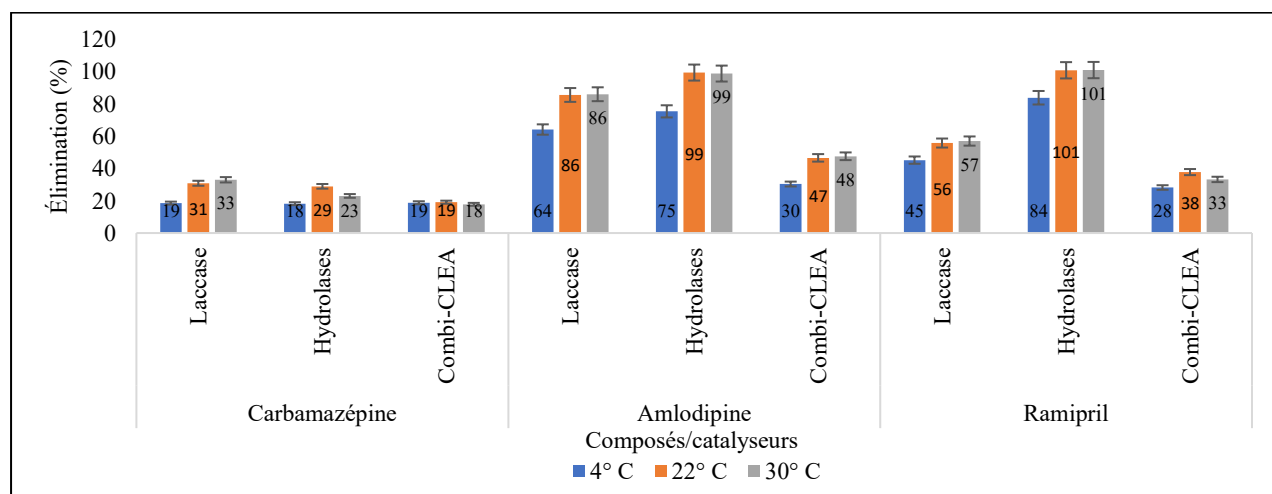
b)



c)

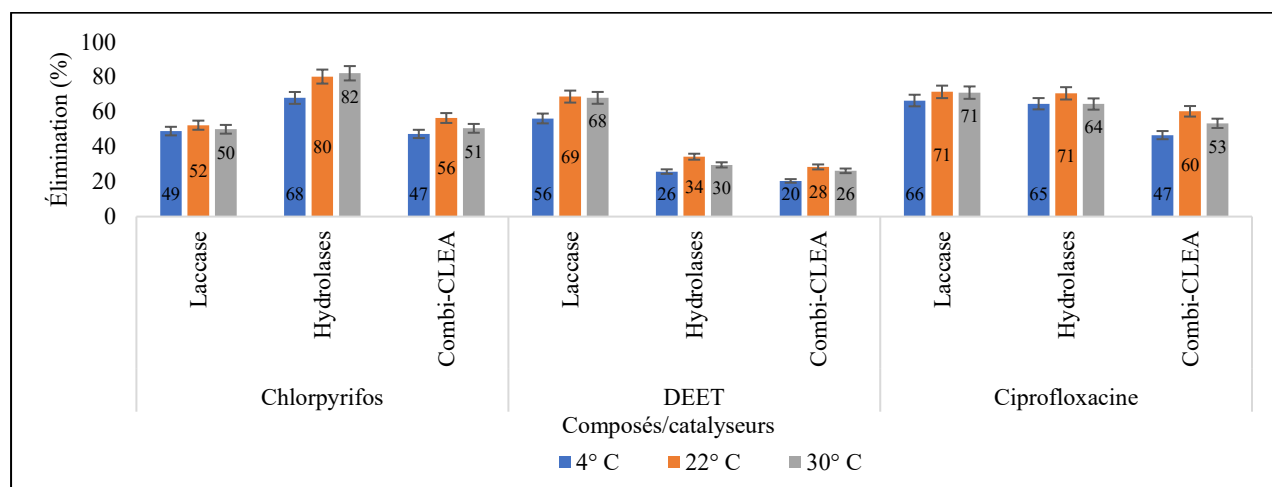


d)

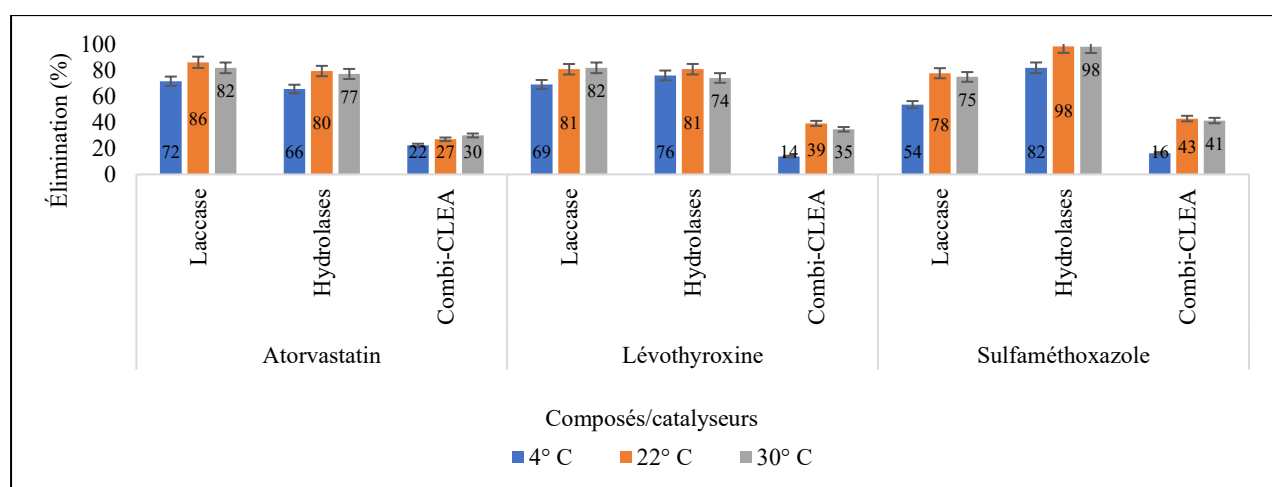




e)



f)

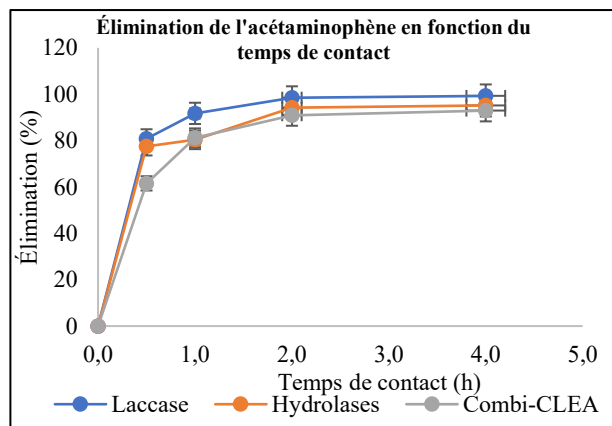


**Figure 3. 4 Élimination des TrOC après 24 h de traitement, au pH 7, à 4 °C, 22 °C et 30 °C, par la laccase (1000 U/l), le mélange d’amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g))**

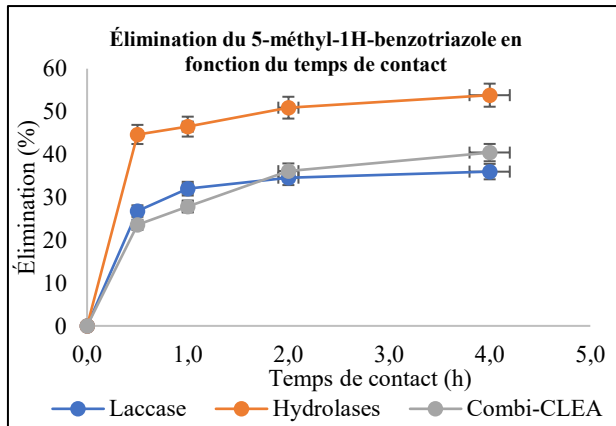
La figure 3.5 (a-u) présente l’impact du temps de contact entre les catalyseurs et les TrOC sur les rendements d’élimination. Pour chaque catalyseur, différentes cinétiques de dégradation ont été observées en fonction des composés éliminés. Les concentrations résiduelles des TrOC ont été mesurées après 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h et 4 h d’incubation. Globalement, en dehors de l’acétaminophène, les taux d’enlèvement observés en 24 h de traitement n’ont pas été atteints au bout de 4 h de traitement. En d’autres termes, pour la majorité des composés, il a fallu plus de 4 h de traitement pour atteindre les rendements d’élimination de 24 h. Ce résultat serait lié à, entre autres facteurs, la structure moléculaire des contaminants et les conditions du milieu telles que le pH, la température, la concentration des contaminants et des catalyseurs.

Considérant donc l'exemple de l'acétaminophène, en 30 minutes, ce composé a été éliminé à 80 % par la laccase libre contre 77 % avec le mélange d'hydrolases libres et 62 % avec la combi-CLEA. Au bout de 2 h d'incubation, les rendements d'élimination de l'acétaminophène ont atteint respectivement 98 %, 94 % et 91 % avec la laccase, le mélange d'hydrolase et la combi-CLEA.

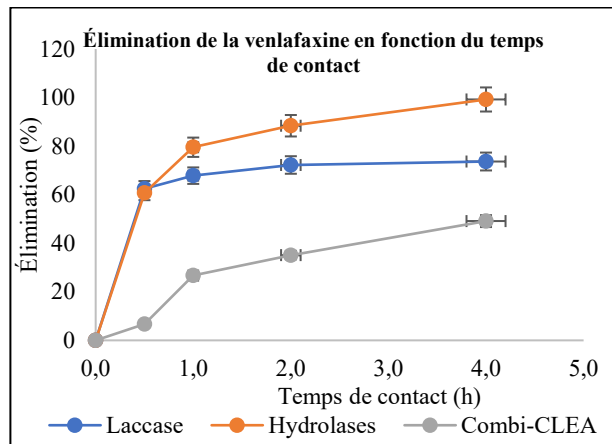
a)



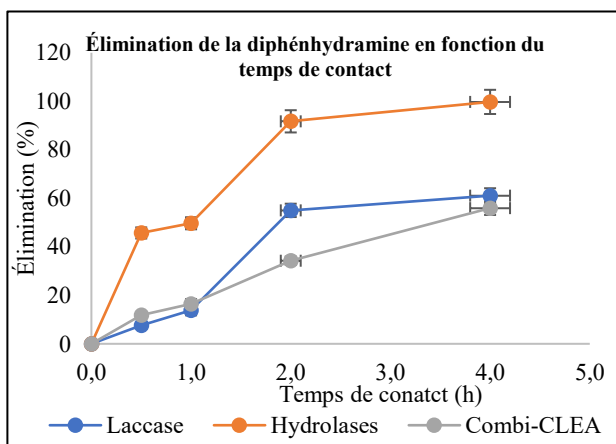
b)



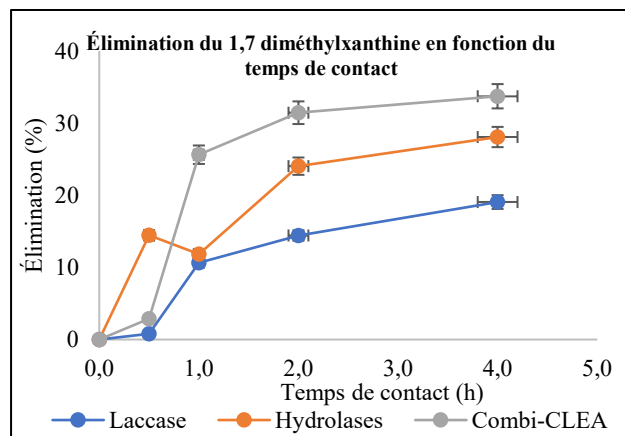
c)



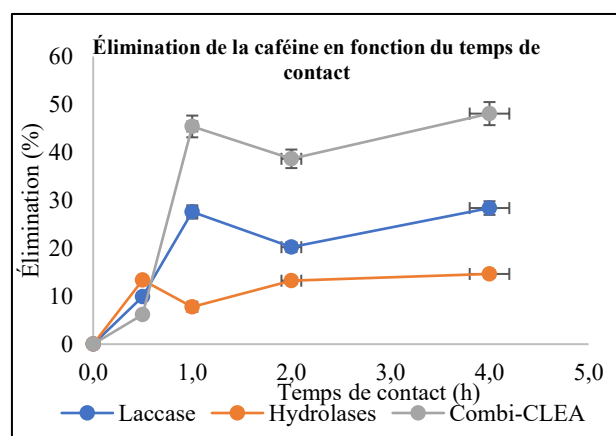
d)



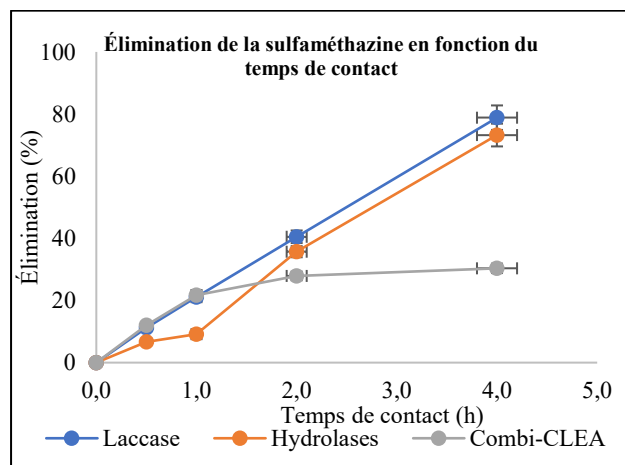
e)



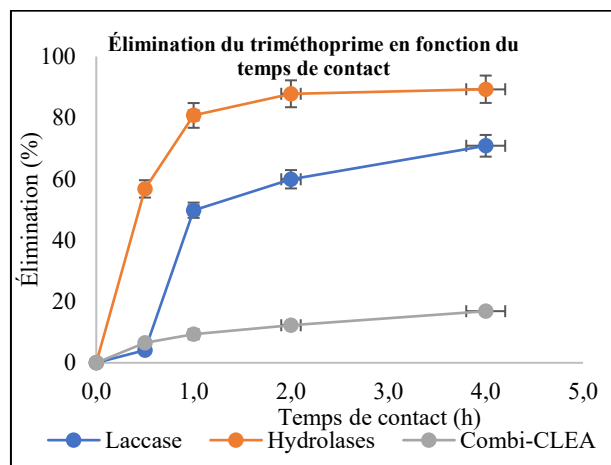
f)



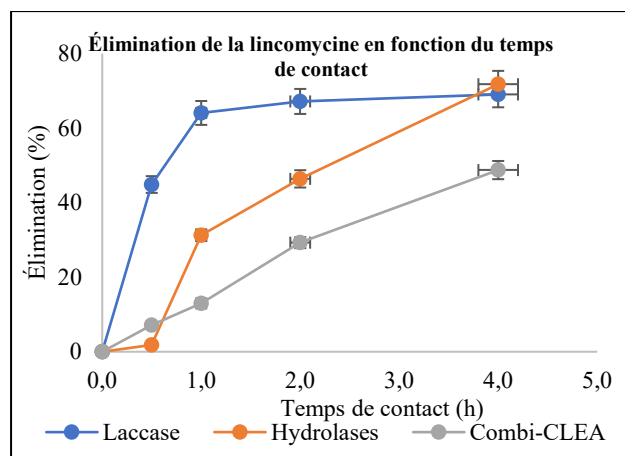
g)



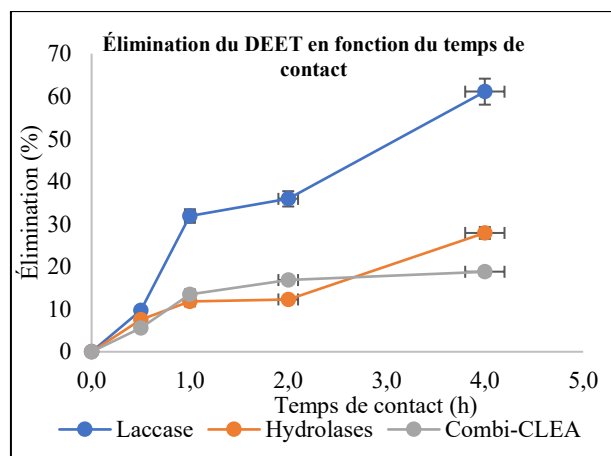
h)



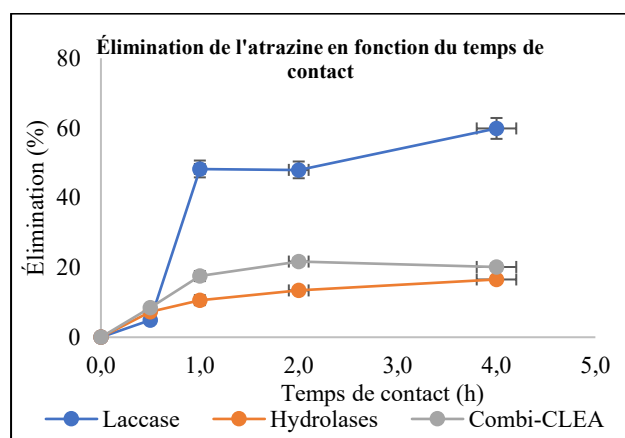
i)



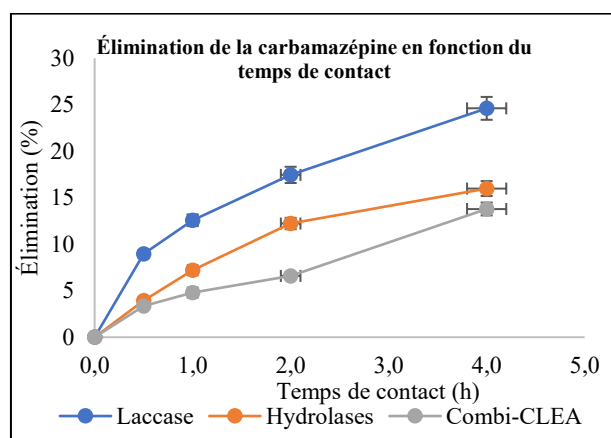
j)



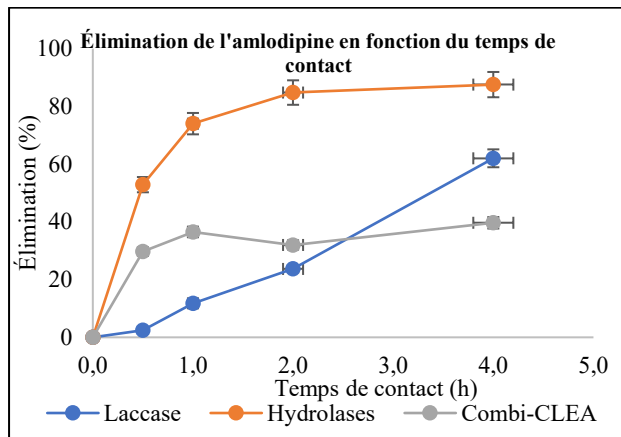
k)



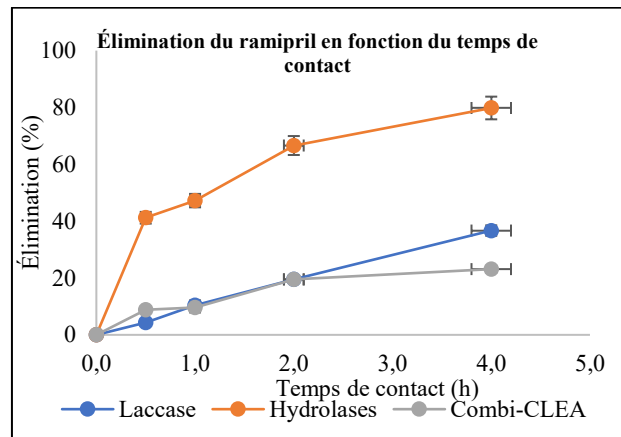
l)



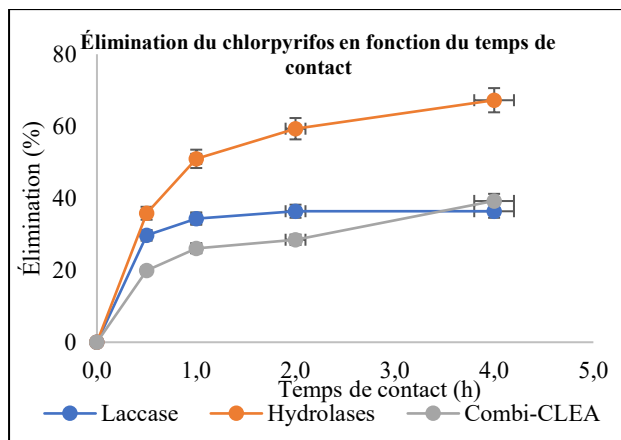
m)



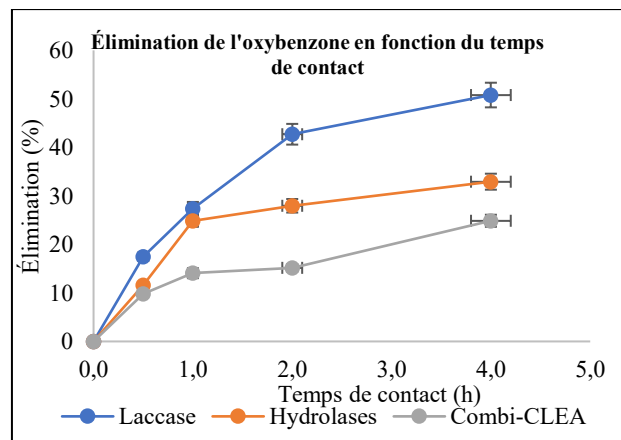
n)



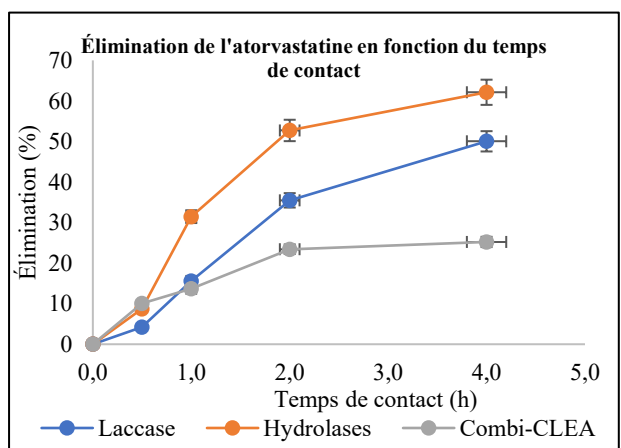
o)



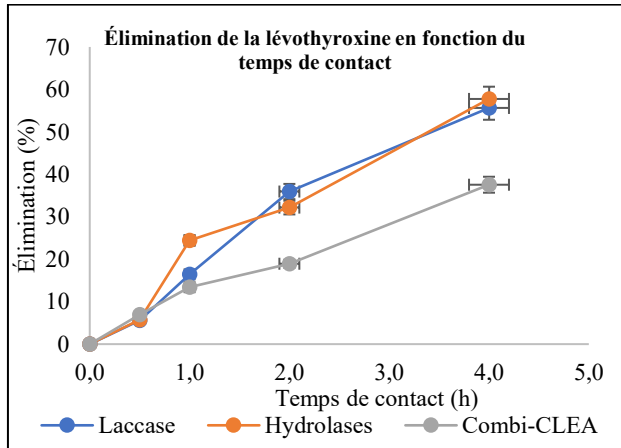
p)



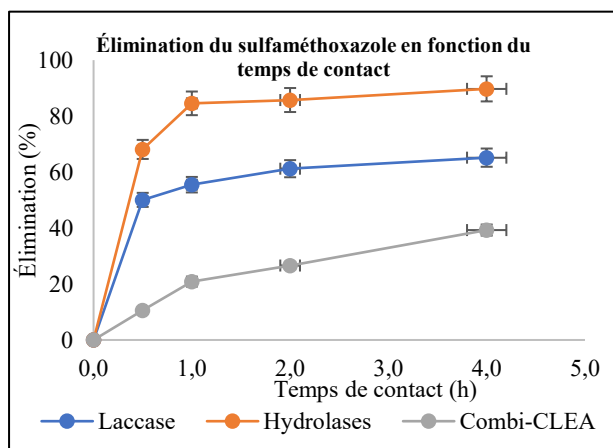
q)



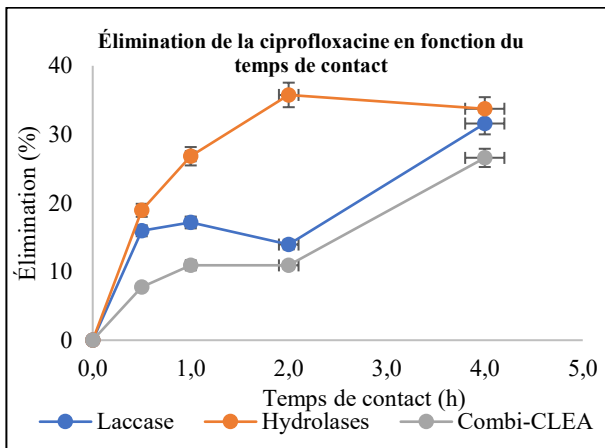
r)



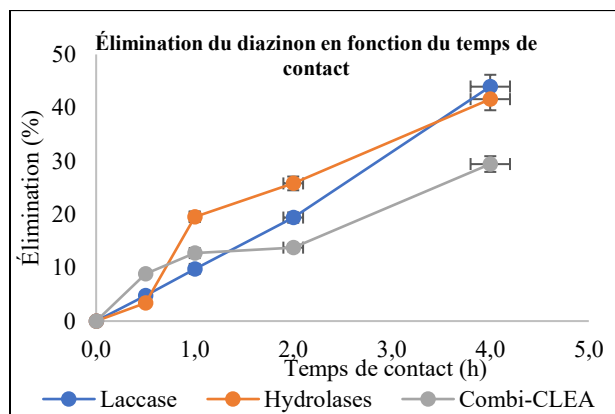
s)



t)



u)



**Figure 3. 5 Cinétique de l'élimination des TrOC (entre 0 et 4 h de contact) à 22 °C et pH 7, par la laccase (1000 U/l), le mélange d'amylase (23 U/l), de lipase (20 U/l), de cellulase (235 UPF/l) et de protéase (418 U/l) et 5 mg de combi-CLEA (laccase (26 U/g), amylase (163,1 U/g), lipase (5,2 U/g), cellulase (ND), protéase (18,6 U/g))**

L'application des formes libres de la laccase de *T. hirsuta* et du mélange d'hydrolases à l'enlèvement des TrOC présents à 10 µg/l dans un échantillon d'eau usée synthétique a révélé un potentiel intéressant de ces enzymes pour la décontamination. Pour la première fois, un catalyseur insolubilisé (combi-CLEA) a été formé à partir de la laccase et de quatre enzymes hydrolytiques dont la protéase, dotée de capacité protéolytique sur les autres enzymes. Globalement, ce catalyseur insolubilisé a permis une élimination partielle des mêmes molécules éliminées par les enzymes libres. Par ailleurs, la combi-CLEA a démontré des taux de récupération d'activité enzymatique spécifique en accord avec certains résultats de recherches antérieures. Cependant, l'étude de la stabilité de la combi-CLEA a montré qu'après 24 h d'exposition aux contaminants, ce catalyseur était moins stable que ses homologues libres. En optimisant les conditions de sa préparation, il peut constituer un catalyseur stable, versatile et à large spectre d'action (Arsenault et al., 2012).

De l'étude de l'impact des paramètres opératoires (pH, température et temps de contact) sur l'élimination des TrOC, il se dégage les principaux constats suivants :

- En fonction du pH, une corrélation claire avec l'élimination des contaminants n'a pas été observée pour les trois catalyseurs. La petitesse de la bande de pH testés pourrait être une explication de cette observation. Cependant, dans la pratique, cette plage de pH est effectivement représentative de la situation réelle rencontrée dans STEP et est par ailleurs conforme aux valeurs prescrites par les réglementations visant les rejets d'eaux usées au Québec et au Canada. Cependant, le choix d'un temps de contact plus court pourrait permettre de percevoir distinctement l'effet du pH sur les rendements d'élimination. De plus, la stabilité des enzymes au fil du traitement est un paramètre prépondérant pour l'efficacité de l'élimination. La détermination des activités résiduelles après le traitement apporterait davantage de compréhension sur l'impact du pH sur les taux d'enlèvement observés.
- Les tests d'élimination des TrOC ont été réalisés en considérant trois différentes températures, soit 4 °C, 22 °C et 30 °C. En effet, ces valeurs sont compatibles avec les conditions de température rencontrées dans les STEP au Québec. De ces trois températures, les rendements d'élimination les plus élevés ont été notés à 22 °C et 30 °C. Du point de vue de la thermodynamique, l'agitation moléculaire est une hypothèse supportant ces résultats.
- Enfin, en fonction du temps de contact, entre 0 h et 4 h, plus le temps d'incubation était long, plus le rendement d'élimination était élevé. En dehors de l'acétaminophène, les rendements d'élimination obtenus après 24 h de traitement n'ont pas été atteints en 4 h de traitement.

## CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce mémoire avait pour objet l'examen de la capacité de la laccase fongique de *Trametes hirsuta* et d'un mélange d'hydrolases sous formes libres ainsi que celle de la combi-CLEA formée *via* la précipitation et la réticulation de ces enzymes, à transformer un cocktail de 22 TrOC présents à 10 µg/l dans une eau usée synthétique. Dans les chapitres 1 et 2, une mise en contexte de la problématique de la présence des TrOC dans l'environnement et un bref aperçu des techniques de traitement établies et en développement ont été présentés. Subséquemment, au chapitre 3, l'approche par catalyse enzymatique, cœur de ce travail, a été appliquée. À l'issue de cette étude, la laccase et le mélange d'hydrolases sous formes libres ainsi que la combi-CLEA ont été testés avec succès pour l'élimination des TrOC.

Après 24 h de traitement de type séquentiel, à 22 °C et au pH 7, l'acétaminophène a été éliminé à 99 % par la laccase. Toutefois, le second composé phénolique parmi les TrOC ciblés, l'oxybenzone, a été éliminé seulement à 64 % par cette enzyme. De plus, un certain nombre de composés non phénoliques, notamment la sulfaméthazine, la lévothyroxine, la lincomycine, l'atorvastatin, le triméthoprim, le sulfaméthoxazole et la venlafaxine ont été bien éliminés par la laccase. La présence simultanée de groupes accepteurs et donneurs d'électrons dans la structure moléculaire de ces composés, ainsi que les réactions croisées générées suite à la formation de radicaux issus de certains composés sont des pistes d'explication possibles de ces résultats.

L'application du mélange d'hydrolases sous formes libres à l'élimination des TrOC a démontré des performances très valorisables de ce mélange d'enzymes pour les bioprocédés et les technologies vertes pour l'enlèvement des TrOC dans les eaux usées. En effet, l'application de ce groupe d'enzymes a permis d'atteindre des rendements proches de l'élimination de composés tels que l'acétaminophène, la venlafaxine, la diphenhydramine, la sulfaméthazine, le triméthoprim, la lincomycine et l'amlodipine.

Un sous-objectif majeur atteint par ce travail a été la synthèse et la caractérisation d'une combi-CLEA de laccase et du mélange d'hydrolases, puis son utilisation pour le traitement des TrOC. Les taux de récupération d'activité enzymatique spécifique étaient de 25,5 % pour la laccase, 49,2 % pour l'amylase, 30,5 % pour la protéase et une hyperactivation (663,3 %) pour la lipase, avec les substrats spécifiques. L'application de ce catalyseur insolubilisé pour l'élimination des TrOC dans la solution synthétique a révélé des rendements d'élimination certes globalement moindres que ceux des enzymes libres. En particulier, l'acétaminophène, le diazinon et la lincomycine figurent en tête des composés les mieux éliminés. Toutefois, ces résultats confirment l'existence d'un potentiel de ce catalyseur pour l'élimination des contaminants organiques. De plus, il convient de souligner que la charge en termes d'activité de la combi-CLEA était, elle aussi inférieure aux charges des enzymes libres pour les mêmes concentrations de contaminants. En

fait, l'élément le plus déterminant à considérer est la stabilité du catalyseur dans le temps, après plusieurs utilisations.

En outre, ce travail s'est penché sur l'étude de l'impact du pH, de la température et du temps de contact entre les catalyseurs et les TrOC sur l'élimination de ces derniers. Il en ressort que, des trois températures testées, les meilleurs rendements d'élimination ont été obtenus à 22 °C et 30 °C. Par contre, l'étude de l'impact du pH, réalisée sur la plage restreinte proche de la zone neutre (6 à 8) n'a pas révélé un profil d'élimination clairement discriminatoire en fonction de ce paramètre. Enfin, globalement, en dehors de quelques composés, les rendements d'élimination semblent montrer une relation linéaire avec le temps de contact. De plus, ces rendements sont inférieurs à ceux issus de traitements de plus longue durée, soit 24 h.

Nonobstant ces résultats hautement appréciables, des défis importants se dressent encore sur la voie du passage à l'échelle industrielle de la catalyse enzymatique pour l'enlèvement des TrOC dans les eaux usées réelles. À l'instar de la présente étude, les tests de procédés enzymatiques pour le traitement des TrOC dans les eaux usées réalisés à date se limitent au cadre du laboratoire et très peu à l'échelle pilote. Par ailleurs, dans cette étude, le milieu de réaction a été idéalisé avec l'utilisation de l'eau ultrapure comme matrice. Or, concentrant les eaux usées domestiques et industrielles et les eaux de ruissellement, les effluents municipaux contiennent des particules en suspension, des sels et sont aussi le réceptacle de toutes sortes de micropolluants organiques, de métaux ou d'agents pathogènes. Tous ces éléments et les conditions régnant dans les effluents réels (agitation mécanique, pH, température, etc.) peuvent significativement modifier le comportement des catalyseurs enzymatiques et influencer grandement l'efficacité des traitements.

Plusieurs facteurs déterminants dans l'efficacité des traitements des TrOC par des procédés enzymatiques sont liés aux propriétés intrinsèques des catalyseurs. Par exemple, certaines enzymes démontrent une haute sélectivité, c'est-à-dire qu'elles sont stéréosélectives, régiosélectives et chimiosélectives (Sheldon, 2007a). Cette propriété s'avère très utile dans la synthèse chimique, car elle permet de réduire ou d'éliminer l'utilisation de groupes chimiques protecteurs, de minimiser les réactions secondaires non désirées ou de réduire les impacts environnementaux (Nair, Denard et Zhao, 2010). Par contre, la sélectivité rétrécit le champ d'action des catalyseurs dans les médias environnementaux qui accumulent un nombre important de contaminants structurellement différents tel qu'évoqué auparavant. Par ailleurs, aujourd'hui, il s'avère encore nécessaire de combler plusieurs lacunes dans la compréhension mécanistique de nombreuses réactions catalysées par les enzymes. Ces lacunes relativisent la prédiction des réactions par catalyse enzymatique de contaminants organiques et laissent également en suspens plusieurs questions sur la nature et la toxicité des produits dérivés. Or, une meilleure connaissance en cette matière offrirait par exemple la



possibilité d'une sélection rigoureuse des catalyseurs appropriés en fonction des caractéristiques des effluents à traiter.

Les catalyseurs insolubilisés tels que la combi-CLEA synthétisée dans cette étude sont un outil efficace pour limiter la dénaturation physique, chimique et biologique associée aux enzymes libres. Cependant, leur préparation à partir de plusieurs enzymes telle qu'elle a été réalisée dans cette étude ne permet pas d'obtenir un « super catalyseur » additionnant les performances catalytiques individuelles des enzymes de départ. Il s'agit plutôt d'une démarche somme toute complexe, combinant des conditions, des caractéristiques et des ingrédients initiaux aux propriétés parfois divergentes (ex. : pH optimum), afin d'aboutir à un produit optimal parmi d'autres possibles.

Finalement, cette étude pose les premiers pas de la construction d'un biocatalyseur robuste et versatile avec des capacités renforcées impliquant une enzyme oxydative et quatre hydrolases. Dans cette perspective, logiquement, les étapes subséquentes de ce travail seraient i) l'optimisation de la préparation de la combi-CLEA, ii) l'étude de sa stabilité physique, biologique et chimique (aux différents températures, pH et temps de contact), iii) le test de son efficacité pour le traitement d'eaux usées réelles et iv) son utilisation dans un procédé continu tel qu'un réacteur membranaire enzymatique.

## RÉFÉRENCES

- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J. et Sturve, J. (2002). Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, 46(9-10), 1485-1489
- Ahn, M.-Y., Dec, J., Kim, J.-E. et Bollag, J.-M. (2002). Treatment of 2,4-Dichlorophenol Polluted Soil with Free and Immobilized Laccase. *Journal of Environment Quality*, 31(5), 1509. doi:10.2134/jeq2002.1509
- Al-Bahry, S. N., Mahmoud, I. Y., Paulson, J. R. et Al-Musharafi, S. K. (2015). Antibiotic resistant bacteria in terrestrial and aquatic environments: A review. *The International Arabic Journal of Antimicrobial Agents*, 4(3) 1-11. doi:10.3823/754
- Arsenault, A., Cabana, H. et Jones, J. P. (2012). Laccase-Based CLEAs: Chitosan as a Novel Cross-Linking Agent. *SAGE-Hindawi Access to Research*, 2011(376015). doi:10.4061/2011/376015
- Asif, M. B., Hai, F. I., Kang, J., van de Merwe, J. P., Leusch, F. D. L., Price, W. E. et Nghiem, L. D. (2018). Biocatalytic degradation of pharmaceuticals, personal care products, industrial chemicals, steroid hormones and pesticides in a membrane distillation-enzymatic bioreactor. *Bioresource Technology*, 247, 528-536. doi:10.1016/j.biortech.2017.09.129
- Asif, M. B., Hai, F. I., Singh, L., Price, W. E. et Nghiem, L. D. (2017). Degradation of Pharmaceuticals and Personal Care Products by White-Rot Fungi—a Critical Review. *Current Pollution Reports*, 3(2), 88-103. doi:10.1007/s40726-017-0049-5
- Auriol, M. (2007). Enlèvement des perturbateurs endocriniens (hormones) par oxydation enzymatique, dans les eaux usées. *Thèse de doctorat* présentée à l'Institut national de la recherche scientifique, Centre Eau, Terre et Environnement, Québec, Canada. 432 p.
- Aust, S. D. et Benson, J. T. (1993). The fungus among us: use of white rot fungi to biodegrade environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 101(3), 232-233. doi:10.1289/ehp.93101232
- Ba, S., Jones, J. P. et Cabana, H. (2014). Hybrid bioreactor (HBR) of hollow fiber microfilter membrane and cross-linked laccase aggregates eliminate aromatic pharmaceuticals in wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 662-670. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.08.062
- Ballerini, D. (2011). *Les biocarburants: Répondre aux défis énergétiques et environnementaux des transports*. Paris, France: Éditions Technip.
- Barbosa, O., Ortiz, C., Berenguer-Murcia, Á., Torres, R., Rodrigues, R. C. et Fernandez-Lafuente, R. (2014). Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.*, 4(4), 1583-1600. doi:10.1039/C3RA45991H
- Barnes, K. K., Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Zaugg, S. D., Meyer, M. T. et Barber, L. B. (2008). A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of The Total Environment*, 402(2-3), 192-200 doi:10.1016/j.scitotenv.2008.04.028

- Belgiorno, V. et Rizzo, L. (2012). *Emerging contaminants into the environment: Contamination pathways and control* (1st edition edition)
- Bensoussan, C. et De Gunzburg, J. (2012, 19 janvier). Méthodes d'inactivation d'antibiotiques [Patent Application]. Demande de brevet international. N° de la demande internationale PCT/EP2011/062014. Repéré à <https://patentscope.wipo.int/search/fr/detail.jsf?docId=WO2012007536>
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. et Lubert Stryer, L. (2002). *Biochemistry*, 5th edition. New York: W H. Freeman; 2002. ISBN-10: 0-7167-3051-0
- Bester, K. (2003). Triclosan in a sewage treatment process—balances and monitoring data. *Water Research*, 37(16), 3891-3896. doi:10.1016/S0043-1354(03)00335-X
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. et Yaguchi, M. (1995). Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,2-Azinobis(3-Ethylbenzthiazoline- 6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(5), 1876–1880.
- Brown, I., Dafforn, T. R., Fryer, P. J. et Cox, P. W. (2013). Kinetic study of the thermal denaturation of a hyperthermostable extracellular  $\alpha$ -amylase from *Pyrococcus furiosus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(12), 2600-2605.
- Boxall, A. B. A., Rudd, M. A., Brooks, B. W., Caldwell, D. J., Choi, K., Hickmann, S., ... Van Der Kraak, G. (2012). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What Are the Big Questions? *Environmental Health Perspectives*, 120(9), 1221-1229. doi:10.1289/ehp.1104477
- Bradley, P. M., Journey, C. A., Romanok, K. M., Barber, L. B., Buxton, H. T., Foreman, W. T., ... Villeneuve, D. L. (2017). Expanded Target-Chemical Analysis Reveals Extensive Mixed-Organic-Contaminant Exposure in U.S. Streams. *Environmental Science & Technology*, 51(9), 4792-4802. doi:10.1021/acs.est.7b00012
- Brar, S. K. (2018, juin). Degradation of emerging contaminants in wastewater-AOPs. Communication présentée dans le programme Cours INRS-ÉTÉ, Québec.
- Buser, H.-R., Poiger, T. et Müller, M. D. (1999). Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33(15), 2529-2535. doi:10.1021/es981014w
- Cabana, H., Jiwan, J.-L. H., Rozenberg, R., Elisashvili, V., Penninckx, M., Agathos, S. N. et Jones, J. P. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriopsis polyzona*. *Chemosphere*, 67(4), 770-778. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.10.037
- Cabana, H., Jones, J. P. et Agathos, S. N. (2007). Preparation and characterization of cross-linked laccase aggregates and their application to the elimination of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Biotechnology*, 132(1), 23-31. doi:10.1016/j.jbiotec.2007.07.948
- Cabana, H. (2008). Élimination des perturbateurs endocriniens nonylphénol, bisphénol A et triclosan par l'action oxydative de la laccase de *Coriopsis polyzona*. *Thèse de doctorat*. Département de Génie Chimique. Université de Sherbrooke, Québec, Canada.

- Cao, L. (2005). Carrier-bound Immobilized Enzymes. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 580 p.
- Cao, L., Langen, L. van et Sheldon, R. A. (2003). Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Current Opinion in Biotechnology*, 14(4), 387-394. doi:10.1016/S0958-1669(03)00096-X
- Casas-Godoy, L., Gasteazoro, F., Duquesne, S., Bordes, F., Marty, A. et Sandoval, G. (2018). Lipases: An Overview. Dans G. Sandoval (dir.), *Lipases and Phospholipases*, 1835(0), 3-38. New York, NY : Springer New York. doi:10.1007/978-1-4939-8672-9\_1
- CCE (2001). *The implementation of the Community strategy for endocrine disruptors: A range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife*. Commission of the European Communities, COM(1999) 706 final, Bruxelles, Belgique, 45 p.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N. et Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research*, 39(19), 4797-4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015
- Couto, S. R. et Toca-Herrera, J. L. (2006). Laccases in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1 (4), 115-120
- D'Annibale, A., Rita Stazi, S., Vinciguerra, V., Di Mattia, E. et Giovannozzi Sermanni, G. (1999). Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochemistry*, 34(6-7), 697-706. doi:10.1016/S0032-9592(98)00144-7
- Daughton, C. G. et Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives*, 107(6), 907-938. doi:10.2307/3434573
- David, A. et Pancharatna, K. (2009). Effects of acetaminophen (paracetamol) in the embryonic development of zebrafish, *Danio rerio*. *Journal of Applied Toxicology*, 29(7), 597-602. doi:10.1002/jat.1446
- de Araujo, C. A. V., Maciel, G. M., Rodrigues, E. A., Silva, L. L., Oliveira, R. F., Brugnari, T., ... de Souza, C. G. M. (2017). Simultaneous Removal of the Antimicrobial Activity and Toxicity of Sulfamethoxazole and Trimethoprim by White Rot Fungi. *Water, Air, & Soil Pollution*, 228(9), 341. doi:10.1007/s11270-017-3525-z
- de Cazes, M., Belleville, M.-P., Petit, E., Llorca, M., Rodríguez-Mozaz, S., de Gunzburg, J., ... Sanchez-Marcano, J. (2014). Design and optimization of an enzymatic membrane reactor for tetracycline degradation. *Catalysis Today*, 236, 146-152. doi:10.1016/j.cattod.2014.02.051
- de Cazes, Matthias, Abejón, R., Belleville, M.-P. et Sanchez-Marcano, J. (2014). Membrane Bioprocesses for Pharmaceutical Micropollutant Removal from Waters. *Membranes*, 4(4), 692-729. doi:10.3390/membranes4040692

- Demarche, P., Junghanns, C., Nair, R. R. et Agathos, S. N. (2012). Harnessing the power of enzymes for environmental stewardship. *Biotechnology Advances*, 30(5), 933-953. doi:10.1016/j.biotechadv.2011.05.013
- Delaplane, K. S. (1996). Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends. The University of Georgia, Athens, Georgia. Pp. 6. Repéré à <http://people.forestry.oregonstate.edu/steve-strauss/sites/people.forestry.oregonstate.edu/steve-strauss/files/PestUse1996.pdf>
- Deziel, N. (2014). Pharmaceuticals in Wastewater Treatment Plant Effluent Waters. *Morris Undergraduate Journal*, 1(12), 1-21
- Dionysiou et K. Kümmerer (dir.), Advanced Treatment Technologies for Urban Wastewater Reuse Cham : Springer International Publishing. 45(39-77). doi:10.1007/698\_2014\_318
- Dodson, R. E., Nishioka, M., Standley, L. J., Perovich, L. J., Brody, J. G. et Rudel, R. A. (2012). Endocrine Disruptors and Asthma-Associated Chemicals in Consumer Products. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 935-943. doi:10.1289/ehp.1104052
- Environmental Health Perspectives. (2019). Repéré à <https://ehp.niehs.nih.gov/>. Page consultée le 3 novembre 2019
- Essigmann, J., Stubbe, J. et Fedeles. B. 5.07SC Biological Chemistry I. Fall 2013. Massachusetts Institute of Technology: MIT OpenCourseWare, <https://ocw.mit.edu>. License: Creative Commons BY-NC-SA
- Facchin, S., Alves, P. D. D., Siqueira, F. de F., Barroca, T. M., Victória, J. M. N. et Kalapothakis, E. (2013). Biodiversity and secretion of enzymes with potential utility in wastewater treatment. *Open Journal of Ecology*, 03(01), 34-37. doi:10.4236/oje.2013.31005
- Fatta-Kassinos, D., Dionysiou, D. D. et Kümmerer, K. (dir.). (2016). *Advanced Treatment Technologies for Urban Wastewater Reuse* (vol. 45). Cham : Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-23886-9
- Fent, K., Weston, A. et Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122-159. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Ferrari, B., Paxéus, N., Giudice, R. L., Pollio, A. et Garric, J. (2003). Ecotoxicological impact of pharmaceuticals found in treated wastewaters: study of carbamazepine, clofibric acid, and diclofenac. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55(3), 359-370. doi:10.1016/S0147-6513(02)00082-9
- Garcia, H. A., Hoffman, C. M., Kinney, K. A. et Lawler, D. F. (2011). Laccase-catalyzed oxidation of oxybenzone in municipal wastewater primary effluent. *Water Research*, 45(5), 1921-1932. doi:10.1016/j.watres.2010.12.027
- García-Galán, M. J., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Vicent, T., Caminal, G., Díaz-Cruz, M. S. et Barceló, D. (2011). Biodegradation of sulfamethazine by *Trametes versicolor*: Removal from sewage sludge and identification of intermediate products by UPLC-QqTOF-MS. *Science of The Total Environment*, 409(24), 5505-5512. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.08.022

- Garcia-Morales, R., Rodríguez-Delgado, M., Gomez-Mariscal, K., Orona-Navar, C., Hernandez-Luna, C., Torres, E., ... Ornelas-Soto, N. (2015). Biotransformation of Endocrine-Disrupting Compounds in Groundwater: Bisphenol A, Nonylphenol, Ethynylestradiol and Triclosan by a Laccase Cocktail from *Pycnoporus sanguineus* CS43. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(8), 251. doi:10.1007/s11270-015-2514-3
- Gaw, S., Thomas, K. V. et Hutchinson, T. H. (2014). Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1656), 1-11. doi:10.1098/rstb.2013.0572
- Geissen, V., Mol, H., Klumpp, E., Umlauf, G., Nadal, M., van der Ploeg, M., ... Ritsema, C. J. (2015). Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management. *International Soil and Water Conservation Research*, 3(1), 57-65. doi:10.1016/j.iswcr.2015.03.002
- Gianfreda, L. et Rao, M. A. (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(4), 339-354. doi:10.1016/j.enzmtec.2004.05.006
- Gianfreda, L., Xu, F. et Bollag, J.-M. (1999). Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal*, 3(1), 1-26. doi:10.1080/10889869991219163
- Gopinath, S. C. B., Anbu, P., Arshad, M. K. M., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U. et Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *BioMed Research International*, 2017(1272193), 1-9. doi:10.1155/2017/1272193
- Gouvernement du Canada. (2019). Liste des substances toxiques : nonylphénol et ses dérivés éthoxylates Repéré à <https://www.canada.ca/fr/environnement-changement-climatique/services/gestion-substances-toxiques/liste-loi-canadienne-protection-environnement/nonylphenol-et-hoxylates.html>. Page consultée le 16 octobre 2019
- Green, R. E., Newton, I., Shultz, S., Cunningham, A. A., Gilbert, M., Pain, D. J. et Prakash, V. (2004). Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent: Vulture population declines and diclofenac. *Journal of Applied Ecology*, 41(5), 793-800. doi:10.1111/j.0021-8901.2004.00954.x
- Guauque Torres, M., Foresti, M. et Ferreira, M. (2013). Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of selected lipases: a procedure for the proper calculation of their recovered activity. *AMB Express*, 3(1), 25. doi:10.1186/2191-0855-3-25
- Gupta, R., Gigras, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K. et Chauhan, B. (2003). Microbial  $\alpha$ -amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*, 38(11), 1599-1616. doi:10.1016/S0032-9592(03)00053-0
- Hai, F. I., Nguyen, L. N., Nghiem, L. D., Liao, B.-Q., Koyuncu, I. et Price, W. E. (2014). Trace Organic Contaminants Removal by Combined Processes for Wastewater Reuse. Dans D. Fatta-Kassinos (dir).
- Hanefeld, U. (2013). Immobilisation of hydroxynitrile lyases. *Chemical Society Reviews*, 42(15), 6203–6568. doi:10.1039/c3cs35491a

- Haroune, L. (2016). Vers une compréhension mécanistique de la biocatalyse des composés pharmaceutiques dans des matrices complexes par traitement fongique (*Trametes hirsuta*). *Thèse de Doctorat*. Département de Chimie. Université de Sherbrooke, Québec, Canada. 171 p.
- Hasan, F., Shah, A. A. et Hameed, A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(2), 235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
- Heberer, Th., Reddersen, K. et Mechlinski, A. (2002). From municipal sewage to drinking water: fate and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment in urban areas. *Water Science and Technology*, 46(3), 81-88. doi:10.2166/wst.2002.0060
- Hermansyah, H., Wijanarko, A., Gozan, M., Arbianti, R., Surya, T., Kubo, M., ... Yonemoto, T. (2007). Consecutive Reaction Model For Triglyceride Hydrolysis Using Lipase. *Jurnal Teknologi*, (2), 151-157.
- Hochstrat, R., Schlosser, D., Corvini, P. et Wintengs, T. (2015). Introduction. Dans R. Hochstrat, T. Wintengs et P. Corvini (éd.), *Immobilized Biocatalysts for Bioremediation of Groundwater and Wastewater* (p. 1-12). London, UK: IWA Publishing Alliance House
- Huerta-Fontela, M., Galceran, M. T. et Ventura, F. (2011). Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research*, 45(3), 1432-1442. doi:10.1016/j.watres.2010.10.036
- Hui, T. J., Ariffin, M. M. et Tahir, N. M. (2010). Hydrolysis of chlorpyrifos in aqueous solutions at different temperatures and pH. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 14(2), 50 - 55
- Husk, B., Sanchez, J. S., Leduc, R., Takser, L., Savary, O. et Cabana, H. (2019). Pharmaceuticals and pesticides in rural community drinking waters of Quebec, Canada – a regional study on the susceptibility to source contamination. *Water Quality Research Journal*, 54(2), 88-103. doi:10.2166/wqrj.2019.038
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., ... Arizono, K. (2004). Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicology*, 67(2), 167-179. doi:10.1016/j.aquatox.2003.12.005
- Jakimska, A., Śliwka-Kaszyńska, M., Nagórski, P., Namieśnik, J. et Kot-Wasik, A. (2014). Phototransformation of Amlodipine: Degradation Kinetics and Identification of Its Photoproducts. *PLoS ONE*, 9(10), 9 p. e109206. doi:10.1371/journal.pone.0109206
- Jaeger, K.E., Eggert, T. (2002). Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13(4):390–7.
- Ji, K., Liu, X., Lee, S., Kang, S., Kho, Y., Giesy, J. P. et Choi, K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials*, 254-255, 242-251. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.03.036
- Jia, Z., Yazdani, M., Zhang, G., Cui, J. et Chen, J. (2018). Hydrophobic gating in BK channels. *Nature Communications*, 9(1), 7 p. doi:10.1038/s41467-018-05970-3 72

- Jobling, S., Casey, D., Rodgers-Gray, T., Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., ... Tyler, C. R. (2003). Comparative responses of molluscs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, 65(2), 205-220. doi:10.1016/S0166-445X(03)00134-6
- Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C. R., Brighty, G. et Sumpter, J. P. (1998). Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science & Technology*, 32(17), 2498-2506. doi:10.1021/es9710870
- Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G. et Sumpter, J. P. (1995). A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic. *Environmental Health Perspectives*, 103(6), 582-587.
- Jones-Lepp, T. L., Sanchez, C., Alvarez, D. A., Wilson, D. C. et Taniguchi-Fu, R.-L. (2012). Point sources of emerging contaminants along the Colorado River Basin: Source water for the arid Southwestern United States. *Science of The Total Environment*, 430, 237-245. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.053
- Kapoor, M. et Gupta, M. N. (2012). Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*, 47(4), 555-569. doi:10.1016/j.procbio.2012.01.011
- Karam, J. et Nicell, J. A. (1997). Potential Applications of Enzymes in Waste Treatment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 69(2), 141-153. doi:10.1002/(SICI)1097-4660(199706)69:2<141::AID-JCTB694>3.0.CO;2-U
- Karigar, C. S. et Rao, S. S. (2011). Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research*, 2011(805187), 1-11. doi:10.4061/2011/805187
- Kemper, N. (2008). Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. *Ecological Indicators*, 8(1), 1-13. doi:10.1016/j.ecolind.2007.06.002
- Kim, H.-J., Lee, H.-J., Lee, D.-S. et Kwon, J.-H. (2009). Modeling the Fate of Priority Pharmaceuticals in Korea in a Conventional Sewage Treatment Plant. *Environmental Engineering Research*, 14(3), 186-194. doi:10.4491/eer.2009.14.3.186
- Kolpin, D. W., Blazer, V. S., Gray, J. L., Focazio, M. J., Young, J. A., Alvarez, D. A., ... Barber, L. B. (2013). Chemical contaminants in water and sediment near fish nesting sites in the Potomac River basin: Determining potential exposures to smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *Science of Total Environment*, 443(700-716). doi:10.1016/j.scitotenv.2012.09.063
- Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B. et Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), 1202-1211. doi:10.1021/es011055j
- Kuhad, R. C., Gupta, R. et Singh, A. (2011). Microbial Cellulases and Their Industrial Applications. *Enzyme Research*, 2011, 1-10. doi:10.4061/2011/280696
- Labelle, C. (2000). Les modulateurs endocriniens : le point sur la question. Bibliothèque du Parlement du Canada, Direction de la recherche parlementaire, 31 p.



- Lema Rodicio, J. M., Teresa Moreira, M., Eibes, G., Lu-Chau, T. A., Lloret, L., Taboada, R., ... Feijoo, G. (2014). Enzymatic Reactors Applied for the Biotransformation of Endocrine Disrupting Chemicals. Dans D. A. Lambropoulou et L. M. L. Nollet (dir.), *Transformation Products of Emerging Contaminants in the Environment* (p. 229-260). Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd. doi:10.1002/9781118339558.ch07
- Lindström, A., Buerge, I. J., Poiger, T., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D. et Buser, H.-R. (2002). Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 36(11), 2322-2329. doi:10.1021/es0114254 73
- Liu, Z., Kanjo, Y. et Mizutani, S. (2009). Removal mechanisms for endocrine disrupting compounds (EDCs) in wastewater treatment — physical means, biodegradation, and chemical advanced oxidation: A review. *Science of The Total Environment*, 407(2), 731-748. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.08.039
- Lloret, L., Eibes, G., Lú-Chau, T. A., Moreira, M. T., Feijoo, G. et Lema, J. M. (2010). Laccase-catalyzed degradation of anti-inflammatories and estrogens. *Biochemical Engineering Journal*, 51(3), 124-131. doi:10.1016/j.bej.2010.06.005
- Lopez-Serrano, P., Cao, L., van Rantwijk, F. et Sheldon, R. A. (2002). Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. *Biotechnology Letters* 24, (2002),1379–1383. <https://doi.org/10.1023/A:10198633146462>
- Lu, J., Huang, Q. et Mao, L. (2009). Removal of Acetaminophen Using Enzyme-Mediated Oxidative Coupling Processes: I. Reaction Rates and Pathways. *Environmental Science & Technology*, 43(18), 7062-7067. doi:10.1021/es9002422
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., ... Wang, X. C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment*, 473-474, 619-641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Cruz-Morató, C., Caminal, G. et Vicent, T. (2010). Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*, 176(1-3), 836-842. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.11.112
- Metcalfe, C. (2014). Contaminants of emerging concern in effluents from wastewater treatment plants in the Lake Simcoe watershed, 8 p.
- Metcalfe, C. D. (2013). Pharmaceutical contaminants of emerging concern in the environment: Pharmaceutical contaminants of emerging concern. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(8), 1683-1684. doi:10.1002/etc.2293
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. et Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790-802. doi:10.2144/04375RV01

- Mills, L. J. et Chichester, C. (2005). Review of evidence: Are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations? *Science of The Total Environment*, 343(1-3), 1-34. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.070
- Mimeault, C., Woodhouse, A. J., Miao, X.-S., Metcalfe, C. D., Moon, T. W. et Trudeau, V. L. (2005). The human lipid regulator, gemfibrozil bioconcentrates and reduces testosterone in the goldfish, *Carassius auratus*. *Aquatic Toxicology*, 73(1), 44-54. doi:10.1016/j.aquatox.2005.01.009
- Ministère de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques (MELCC) (2019). *Guide pour l'établissement des normes de rejet à une station d'épuration*, Québec, Direction générale des politiques de l'eau, 56 p. Dépôt légal – Bibliothèque et Archives nationales du Québec, ISBN 978-2-550-83462-5 (PDF)
- Momsia, T. et Momsia, P. (2013). A review on « Microbial lipase-versatile tool for industrial applications *Int. J. Life Sc. Bt & Pharm. Res.* 2013, 2(4), 18 p. ISSN 2250-3137
- Nair, U., Nikhil, Denard, A., Carl et Zhao, H. (2010). Engineering of Enzymes for Selective Catalysis. *Current Organic Chemistry*, 14(17), 1870-1882. doi:10.2174/138527210792927537 74
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D. L., Roddick, F., ... Nghiem, L. D. (2014). Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters, industrial chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: Role of biosorption and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 169-175. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.017
- Nicell, J. A. (2001). Environmental applications of enzymes. *Interdisciplinary Environmental Review*, 3(1), 14 p. doi:10.1504/IER.2001.053866
- Olivier, M. (2017). *Chimie de l'environnement* (2e éd.). Québec, Québec : Lab Éditions. 404 p.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigam, P., Krieger, N. et Soccol, V. T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*, 29(2), 119-131.
- Pérez, J., Muñoz-Dorado, J., de la Rubia, T. et Martínez, J. (2002). Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5(2), 53-63. doi:10.1007/s10123-002-0062-3
- Petrie, B., Barden, R. et Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72(2015), 3-27. doi:10.1016/j.watres.2014.08.053
- Petrovic, M. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685-696. doi:10.1016/S0165-9936(03)01105-1
- Psychologie et santé, Lexique. (2019) Repéré à <http://www.psychomedia.qc.ca/lexique/definition/antagoniste> (Page consultée le 3 novembre 2019).
- PubChem (2019). Repéré à <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>. Page consultée le 16 novembre 2019

- Radjenovic, J., Petrovic, M. et Barceló, D. (2007). Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1365-1377. doi:10.1007/s00216-006-0883-6
- Raghav, M., Eden, S., Witte, B., Polle, J. et Mitchell, K. (2013). Contaminants of Emerging Concern in Water. *Water Resources Research Center College of Agriculture and Life Sciences*. The University of Arizona, 12 p.
- Rao, M. A., Scelza, R., Scotti, R. et Gianfreda, L. (2010). Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 10(3), 333- 353. doi:10.4067/S071895162010000100008
- Rocco, L., Frenzilli, G., Fusco, D., Peluso, C. et Stingo, V. (2010). Evaluation of zebrafish DNA integrity after exposure to pharmacological agents present in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73(7), 1530-1536. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.032
- Rodríguez-Rodríguez, C. E., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Jelić, A., Llorca, M., Farré, M., ... Vicent, T. (2012). Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus *Trametes versicolor* in bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 233-234, 235-243. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.07.024
- Ruggaber, T. P. et Talley, J. W. (2006). Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 10(2), 73-85. doi:10.1061/(ASCE)1090-025X(2006)10:2(73)
- Salazar-Arredondo, E., Solís-Heredia, M. de J., Rojas-García, E., Hernández-Ochoa, I. et Quintanilla-Vega, B. (2008). Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their oxon metabolites in human spermatozoa. *Reproductive Toxicology*, 25(4), 455-460. doi:10.1016/j.reprotox.2008.05.055
- Sankaran, R., Show, P. L. et Chang, J.-S. (2016). Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges: Producing biodiesel from biomass oil via immobilized-lipase catalyzed alcoholysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 10(6), 896-916. doi:10.1002/bbb.1719 75
- Santé Canada. (2012). Communication d'A.-M. Tugulea, Bureau de la science de la santé environnementale et de la recherche, Santé Canada.
- ScienceDirect. (2019) Agonist. Repéré à <https://www.sciencedirect.com/topics/pharmacology-toxicology-and-pharmaceutical-science/agonist>. (Page consultée le 3 novembre 2019)
- Schmidt, O. et Czeschlik, D. (2006). *Wood and tree fungi: biology, damage, protection, and use*. Berlin: Springer.
- Schoevaart, R., Wolbers, M. W., Golubovic, M., Ottens, M., Kieboom, A. P. G., van Rantwijk, F., ... Sheldon, R. A. (2004). Preparation, optimization, and structures of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 87(6), 754-762. doi:10.1002/bit.20184

- Sheldon, R. A. (2007a). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA R s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(2007), 1583-1587
- Sheldon, R. A. (2007b). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 349(8-9), 1289-1307. doi:10.1002/adsc.200700082
- Sheldon, R. A. (2011). Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(3), 467-477. doi:10.1007/s00253-011-3554-2
- Sinclair, C. J. et Boxall, A. B. A. (2003). Assessing the Ecotoxicity of Pesticide Transformation Products. *Environmental Science & Technology*, 37(20), 4617-4625. doi:10.1021/es030038m
- Snyder, S., Vanderford, B., Pearson, R., Quiñones, O. et Yoon, Y. (2003). Analytical Methods Used to Measure Endocrine Disrupting Compounds in Water. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 7(4), 224-234. doi:10.1061/(ASCE)1090-025X(2003)7:4(224)
- Soto, A. M., Justicia, H., Wray, W. et Sonnenschein, C. (1991). p-Nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from « modified » polystyrene. *Environmental Health Perspectives*, 92(1991), 167-173
- Spina, F. et Varese, G. C. (2016). Fungal Bioremediation of Emerging Micropollutants in Municipal Wastewaters. Dans D. Purchase (dir.), *Fungal Applications in Sustainable Environmental Biotechnology* (p. 115-141). Cham : Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-42852-9\_6
- Stevenson, C. et Davies, R. J. H. (1999). Photosensitization of Guanine-Specific DNA Damage by 2-Phenylbenzimidazole and the Sunscreen Agent 2-Phenylbenzimidazole-5-sulfonic Acid. *Chemical Research in Toxicology*, 12(1), 38-45. doi:10.1021/tx980158l
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F. et Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 125-138. doi:10.1007/s11157-008-9130-2
- Suzuki, S., Pruden, A., Virta, M. et Zhang, T. (2017). Editorial: Antibiotic Resistance in Aquatic Systems. *Frontiers in Microbiology*, 8(14), 3 p. doi:10.3389/fmicb.2017.00014
- Tadkaew, N., Hai, F. I., McDonald, J. A., Khan, S. J. et Nghiem, L. D. (2011). Removal of trace organics by MBR treatment: The role of molecular properties. *Water Research*, 45(8), 2439-2451. doi:10.1016/j.watres.2011.01.023 76
- Takamoto, T., Shirasaka, H., Uyama, H. et Kobayashi, S. (2001). Lipase-Catalyzed Hydrolytic Degradation of Polyurethane in Organic Solvent. *Chemistry Letters*, 30(6), 492-493. doi:10.1246/cl.2001.492
- Tanaka, T., Tonosaki, T., Nose, M., Tomidokoro, N., Kadomura, N., Fujii, T. et Taniguchi, M. (2001). Treatment of Model Soils Contaminated with Phenolic Endocrine-Disrupting Chemicals with Lactase from *Trametes* sp. in a Rotating Reactor. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, 92(4), 312-316

- Tellier, S. (2006). *Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses*, Direction des politiques en milieu terrestre, Service des pesticides, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 90 p.
- Ternes, T., A., Joss, A. et Siegrist, H. (2004). Scrutinizing Pharmaceuticals and Personal Care Products in Wastewater Treatment. *Environmental science & technology*, 15(2004), 393-399
- Tokiwa, Y. et Järerat, A. (2004). Biodegradation of poly(l-lactide). *Biotechnology Letters*, 26(10), 771-777. doi:10.1023/B:BILE.0000025927.31028.e3
- Touahar, I. E., Haroune, L., Ba, S., Bellenger, J.-P. et Cabana, H. (2014). Characterization of combined cross-linked enzyme aggregates from laccase, versatile peroxidase and glucose oxidase, and their utilization for the elimination of pharmaceuticals. *Science of The Total Environment*, 481, 90-99. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.132
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(9), 785-799. doi:10.1038/nrd2092
- Uwadiae, S. E., Yerima, Y. et Azike, R. U. (2011). Enzymatic biodegradation of pharmaceutical wastewater. *International Journal of Energy and Environment*, 2(4), 683-690
- Velasco-Lozano, S., López-Gallego, F., Mateos-Díaz, J. C. et Favela-Torres, E. (2016). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA) in enzyme improvement – a review. *Biocatalysis*, 1(1). doi:10.1515/boca-2015-0012
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis, *P&T* 40(4) 277-283
- Verlicchi, P., Al Aukidy, M. et Zambello E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment—A review. *Science of the Total Environment*, 429 (2012) 123–155. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.04.028
- Viswanath, B., Rajesh, B., Janardhan, A., Kumar, A. P. et Narasimha, G. (2014). Fungal Laccases and Their Applications in Bioremediation. *Enzyme Research*, 2014(163242), 1-21. doi:10.1155/2014/163242
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J. V., ... Vethaak, A. D. (2000). Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, with Special Reference to the European Situation. *Critical Reviews in Toxicology*, 30(1), 71-133. doi:10.1080/10408440091159176
- Wang, Y., Wang, X., Li, M., Dong, J., Sun, C. et Chen, G. (2018). Removal of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) from Municipal Waste Water with Integrated Membrane Systems, MBR-RO/NF. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(2), 269. doi:10.3390/ijerph15020269
- Wesenberg, D., Kyriakides, I. et Agathos, S. N. (2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*, 22(1-2), 161-187. doi:10.1016/j.biotechadv.2003.08.011

- WHO (2011). *Pharmaceuticals in Drinking-water*. WHO/HSE/WSH/11.05. Geneva, World Health Organization. 49 p.
- WHO (1994). Lexicon of alcohol and drug terms. 1.Substance abuse-terminology 2.Alcohol-terminology 3.Tabacco-terminology. ISBN 92 4 154468 6. WHO Library Cataloguing in Publication Data. World Health Organization (NLM classification: WM 270)
- Wijekoon, K. C. (2015). Removal of trace organic chemicals by membrane bioreactors and hybrid processes. *Thèse de Doctorat*, 207 p. School of Civil, Mining and Environmental Engineering, University of Wollongong, Australie.
- Wong, D. W. S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(2), 174-209. doi:10.1007/s12010-008-8279-z
- Wu, M., Atchley, D., Greer, L., Janssen, S., Rosenberg, D. et Sass, J. (2009). Preventing pharmaceutical contamination of our nation's drinking water, 64 p.
- Yang, S., Hai, F. I., Nghiem, L. D., Price, W. E., Roddick, F., Moreira, M. T. et Magram, S. F. (2013). Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: A critical review. *Bioresource Technology*, 141, 97-108. doi:10.1016/j.biortech.2013.01.173
- Yu, L., Ardao, I., Ma, Y., Corvini, P. et Agathos, S., N. (2015). Enzyme reactors. Dans R. Hochstrat, T. Wintgens, et P. Corvini, (dir), *Immobilized biocatalysts for bioremediation of groundwater and wastewater* (p. 79-96). Londres, Royaume Uni: IWA Publishing, Alliance House
- Zhang, Y., Geißen, S.-U. et Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151-1161. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.086